

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Química



DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA
GENERACIÓN DE DATOS DE ORDEN SUPERIOR APLICADAS A LA
CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS Y PROTEÍNAS EN PRODUCTOS
ALIMENTICIOS

Milagros Montemurro

Licenciada en Biotecnología

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de Doctora en Química, en el campo de la Química Analítica, desarrollada en el Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Directora: Dra. María Julia Culzoni

Co-director: Dr. Héctor Goicoechea

~ 2018 ~

*“La travesía real del descubrimiento no consiste en buscar nuevos paisajes,
sino en mirar con nuevos ojos”*

M. Proust

Agradecimientos

Llegando al final de esta etapa, quisiera dedicar unas páginas para brindar mi reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que formaron parte, contribuyeron o simplemente me acompañaron y brindaron su apoyo durante este recorrido.

En primer lugar, y ante todo, a mi querida familia. Papá, desde algún lugar me acompañaste en todo momento. Tu ejemplo y enseñanzas me siguen guiando día a día, y este es uno de los resultados de ello. Mamá, sos mi modelo de fortaleza, gracias por estar a mi lado incondicionalmente y bancarme en todas mis locuras. Rosa, mi hermana, amiga y compañera, gracias por estar conmigo, recorriendo cada paso, salto, tropiezo o caída, siempre juntas para adelante. Popo, mi aliado desde que llegué a esta hermosa familia, gracias hermano por transmitirme esa tranquilidad de que siempre puedo contar con vos. Augusto, mi chiquito hermoso, gracias por recordarme con tu amor y bondad infinita lo importante de la vida, por borrar de mi rutina las preocupaciones y llenarla de alegría. A mis tíos y primos, cerca o lejos, gracias por estar siempre presentes y acompañándome en cada momento de mi vida.

A mis amigas, a quienes tengo a mi lado desde hace tanto tiempo. Con los años elegimos caminos diferentes, pero la amistad nos empuja siempre hacia el mismo lugar, en el que nos refugiamos y descansamos cuando el camino no nos lleva a donde creíamos, se pone difícil o simplemente aburrido. Gracias chicas, por ser mi refugio y mi fuente de energía para enfrentar mi camino cada día.

A Pauli, mi gran amiga de la facultad, quien me brindó siempre su apoyo incondicional. Gracias por entenderme y bancarme para poder salir adelante.

A Quela, gracias por haber compartido conmigo todos estos años, en la oficina, en el aula, en colectivos, aviones y aeropuertos. Gracias por estar siempre, por tu alegría y por brindarme tu hermosa amistad.

A mis directores, Julia y Héctor. Héctor, gracias por ayudarme a crecer cada día y por darme siempre la libertad de hacer lo que más me gusta. Juli, gracias por haber estado conmigo, por darme tus consejos y tus palabras de apoyo siempre, el resultado no hubiera sido el mismo sin vos a mi lado.

A todos los integrantes del Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL por acompañarme y brindarme su apoyo en mi formación doctoral.

A los integrantes del Instituto de Química Tecnológica y Analítica, de la Universidad Tecnológica de Viena, en especial a Bernhard Lendl por haberme ofrecido la oportunidad de vivir una experiencia inolvidable, tanto en lo laboral como en lo personal.

Quiero agradecer a dos personas que depositaron su confianza en mí, quienes fueron una pieza fundamental para que llegue hasta este lugar. Merce, estoy inmensamente agradecida por todo lo que me has dado, gracias por tu cariño y por darme siempre la palabra justa y el ánimo para seguir. Caco, me diste y dejaste infinidad de enseñanzas, siempre te recuerdo y agradezco habernos cruzado en el camino.

A todos los integrantes del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, por haber formado parte de una etapa tan importante de mi vida.

A todos los docentes que contribuyen cada día a la formación de profesionales. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Facultad de Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Litoral que logran formar profesionales de prestigio. A la Universidad Tecnológica de Viena, por brindarme el espacio de trabajo en mi estadía en Viena. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Austríaca de Cooperación Internacional en Educación e Investigación (OeAD) por el apoyo recibido para el desarrollo de la tesis y mi formación.

Publicaciones científicas

1. High performance organized media-enhanced spectrofluorimetric determination of pirimiphos-methyl in maize. Milagros Montemurro, Romina Brasca, María J. Culzoni, Héctor C. Goicoechea. **Food Chemistry 278 (2019) 711-719.**

2. Beyond Fourier Transform Infrared Spectroscopy: External Cavity Quantum Cascade Laser-Based Mid-infrared Transmission Spectroscopy of Proteins in the Amide I and Amide II Region. Andreas Schwaighofer, Milagros Montemurro, Stephan Freitag, Christian Kristament, María J. Culzoni, Bernhard Lendl. **Analytical Chemistry 90 (2018) 7072-7079.**

3. Open-source assisted laboratory automation through graphical user interfaces and 3D printers: Application to equipment hyphenation for higher-order data generation. Gabriel G. Siano, Milagros Montemurro, Mirta R. Alcaráz, Héctor C. Goicoechea. **Analytical Chemistry 89 (2017) 10667-10672.**

4. Automatic generation of photochemically induced excitation-emission-kinetic four-way data for the highly selective determination of azinphos-methyl in fruit juices. Milagros Montemurro, Gabriel G. Siano, María J. Culzoni, Héctor C. Goicoechea. **Sensors and Actuators B. Chemistry 239 (2017) 397-404.**

5. Third order chromatographic-excitation-emission fluorescence data: Advances, challenges and prospects in analytical applications. Milagros Montemurro, Gabriel G. Siano, Mirta R. Alcaráz, Héctor C. Goicoechea. **Trends in Analytical Chemistry 119 (2017) 119-133**

6. Highly sensitive quantitation of pesticides in fruit samples by modeling four-way data gathered with high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection. Milagros Montemurro, Licarion Pinto, Germano Vêras, Adriano de Araújo Gomes, María J. Culzoni, Mário C. Ugulino de Araújo, Héctor C. Goicoechea. **Talanta 154 (2016) 208-2018.**

Resumen

En este trabajo se evaluaron estrategias de obtención de datos multidimensionales y se desarrollaron nuevos métodos analíticos para estudios cuantitativos de una variedad de analitos de interés en productos alimenticios, combinando diversas metodologías analíticas con modelado quimiométrico de los datos. Se emplearon técnicas separativas y espectroscópicas para la generación de los datos y se aplicaron algoritmos de primer, segundo y tercer orden para su modelado. Los métodos se evaluaron en base a resultados de predicción de muestras incógnitas y a las cifras de mérito obtenidas para cada sistema.

Por un lado, se llevó a cabo la determinación de proteínas en leche bovina mediante espectroscopia láser infrarroja. Se desarrolló una nueva metodología de infrarrojo (IR) utilizando un láser EC-QCL (*External Cavity-Quantum Cascade Laser*) de última generación como fuente lumínica para mediciones en el IR cercano (MIR) de proteínas en medio acuoso, en la región amida I y amida II ($1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$). Se estudiaron las características espectrales de proteínas con diferentes estructuras secundarias y se comparó el nuevo sistema propuesto con el EC-QCL de primera generación y con dos espectrómetros FT-IR comerciales. El sistema ensamblado se aplicó a la determinación de proteínas en leche bovina, mediante calibración multivariada de primer orden. Se implementaron herramientas quimiométricas para llevar a cabo la calibración en presencia de efecto matriz y se cuantificaron las proteínas individuales y el contenido proteico total en leche, discriminando entre diferentes tipos de leche bovina comercial en base a las concentraciones predichas.

Por otro lado, se realizó la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de maíz y frutas. Para ello, se desarrollaron diferentes métodos basados en la detección mediante espectroscopia de fluorescencia.

En primer lugar, se determinó la concentración de metil-pirimifos en granos de maíz mediante matrices de excitación-emisión de fluorescencia (EEM), estudiando la exaltación de la fluorescencia en medios organizados. Se desarrolló el procedimiento de extracción y limpieza de la muestra y se planteó un esquema de procesamiento de datos para sortear el efecto matriz.

Luego, se desarrolló un método para la cuantificación del plaguicida metil-azinfos en frutas. Para ello, se llevó a cabo la degradación de AZM mediada por luz catalizada en medio alcalino y el monitoreo de la evolución de la reacción mediante EEM, generándose un arreglo de datos tridimensional por muestra. Se evaluaron las ventajas del incremento del orden de los datos a partir del estudio de predicción de muestras de validación y de la estimación de cifras de mérito analíticas.

Por último, se cuantificaron residuos de carbendazin, tiabendazol, fuberidazol carbofurán, carbaril y 1-naftol en frutas, mediante generación y modelado de datos de tercer orden. La generación de los datos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia de barrido rápido, realizando múltiples inyecciones por muestra, a diferentes longitudes de onda de excitación, y registrando las matrices de tiempo-emisión. Se evaluaron las ventajas aportadas por el análisis de este tipo de datos, comparando los resultados obtenidos mediante modelado de segundo y tercer orden.

Índice general

Capítulo 1	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Análisis de muestras alimenticias	2
1.2. Técnicas espectroscópicas	3
1.2.1. Espectroscopia de absorbancia infrarroja	3
1.2.2. Espectroscopia de fluorescencia	5
1.3. Calibración multivariada	7
1.3.1. Clasificación de los datos instrumentales	8
1.3.2. Propiedades de los datos multidimensionales	10
1.3.3. Algoritmos quimiométricos	11
1.3.4. Cifras de mérito analíticas	19
Capítulo 2	24
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivos generales	25
2.2. Objetivos específicos	25
Capítulo 3	26
3. ANÁLISIS DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS MEDIANTE GENERACIÓN Y MODELADO DE DATOS MULTIDIMENSIONALES	27
3.1. Análisis de proteínas en leche bovina mediante espectroscopia láser infrarroja	27
3.1.1. Consideraciones generales	27
3.1.2. Materiales y métodos	30
3.1.3. Resultados	40
3.1.4. Conclusiones	54

3.2.	Cuantificación de metil-pirimifos en granos de maíz mediante modelado de arreglos de tres vías: matrices de excitación-emisión de fluorescencia en medio micelar.....	56
3.2.1.	Consideraciones generales.....	56
3.2.2.	Materiales y métodos.....	59
3.2.3.	Resultados.....	64
3.2.4.	Conclusiones.....	80
3.3.	Cuantificación de metil-azinfos en frutas mediante modelado de arreglo de cuatro vías: matrices de excitación-emisión de fluorescencia inducida por fotoquímica.....	82
3.3.1.	Consideraciones generales.....	82
3.3.2.	Materiales y métodos.....	83
3.3.3.	Resultados.....	87
3.3.4.	Conclusiones.....	97
3.4.	Análisis de residuos de pesticidas en frutas mediante modelado de datos de cuatro vías: cromatografía líquida de alto rendimiento y detección de fluorescencia.....	99
3.4.1.	Consideraciones generales.....	99
3.4.2.	Materiales y métodos.....	100
3.4.3.	Resultados.....	104
3.4.4.	Conclusiones.....	118
Capítulo 4	120
4.	CONCLUSIONES GENERALES.....	121
REFERENCIAS	124

Índice de figuras

Figura 1.1. Tipos de estiramiento y flexión de una molécula de tres átomos lineal o no lineal.....	4
Figura 1.2. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia (A) y matriz de excitación-emisión de fluorescencia (B) de un compuesto orgánico en solución.....	6
Figura 1.3. Clasificación de los datos instrumentales según sus órdenes y el número de vías de sus arreglos	8
Figura 3.1. Esquema del dispositivo ensamblado para las mediciones mediante espectroscopia láser infrarroja.....	36
Figura 3.2. Pasos involucrados en el procesamiento de los datos obtenidos por el EC-QCL.....	39
Figura 3.3. Energía de emisión del EC-QCL en el rango espectral de trabajo (A), espectros de transmitancia de una solución acuosa de BSA (B) y espectros de absorción de la proteína BSA (C). En negro se muestra el resultado sin atenuación de la intensidad de emisión del láser y en azul el resultado con atenuación de la intensidad de emisión del láser mediante la ventana de zafiro (2.5 mm) y la malla metálica.	41
Figura 3.4. Espectros de absorción IR registrados para 3 proteínas con el EC-QCL (A-C) y con un instrumento FT-IR (D-F). Las líneas rojas continua, punteada y discontinua corresponden a concentraciones de 5.0, 2.5 y 1.0 mg mL ⁻¹ , respectivamente.....	43
Figura 3.5. Curvas de calibración obtenidas para BSA, Lys y β -LG. Áreas de las bandas amida I (círculos) y amida II (rombos) en función de la concentración de proteínas y líneas de regresión lineal (líneas continuas negras).	43
Figura 3.6. Líneas 100 % de agua obtenidas con dos EC-QCL (primera y última generación) y con dos instrumentos FT-IR comerciales (Vertex y Tensor).....	45

Figura 3.7. (A) Espectros de absorción IR de las proteínas β -LG (línea celeste), α -LA (línea azul) y Cas (línea roja) en solución acuosa y (B) espectros de absorción de una mezcla ternaria de las proteínas (línea negra) y de una muestra de leche bovina (línea gris).47

Figura 3.8. Concentraciones obtenidas mediante EC-QCL en función de las obtenidas por el método de referencia para las 3 proteínas individuales y para el contenido proteico total (la línea continua negra indica el comportamiento ideal), y las correspondientes EJCRs (la cruz roja indica el punto ideal de pendiente y ordenada al origen).50

Figura 3.9. Concentraciones predichas de β -LG en función de las concentraciones predichas de α -LA para las 19 muestras de leche bovina comerciales analizadas.....53

Figura 3.10. Espectros de absorbancia de PMM obtenidos a diferentes pH en la titulación (A). Perfiles de absorción (B) y de distribución de especies (C) obtenidos por MCR-ALS.....65

Figura 3.11. Influencia de la concentración de CD (A) y surfactante (B) sobre la intensidad de fluorescencia de PMM.....66

Figura 3.12. Espectro de excitación y emisión de agua (línea de puntos gris), PMM en agua (línea continua gris), Brij-35 (línea de puntos roja) y PMF con Brij-35 (línea continua roja).67

Figura 3.13. Cromatograma obtenidos del extracto orgánico de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y de la muestra (línea continua azul). En el recuadro se muestra el espectro de emisión de fluorescencia obtenido en cubeta para el extracto de la muestra adicionada.....69

Figura 3.14. Espectro de excitación del extracto de muestra (línea roja) y espectros de emisión de PMM con diferentes concentraciones de matriz de muestra (líneas en escala de azules). La flecha indica el sentido creciente de concentración de los componentes de la matriz.....70

Figura 3.15. Espectros de excitación y emisión de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y del extracto obtenido de la extracción líquido-líquido en medio ácido (línea continua azul).71

Figura 3.16. Espectros de excitación y emisión de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y del extracto obtenido de la extracción con un cartucho Florisil (línea continua azul).	72
Figura 3.17. Cromatograma del extracto luego del procedimiento de limpieza, de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y de la muestra adicionada (línea continua azul). En línea punteada gris se muestran las soluciones de lavado. En el recuadro se muestra el espectro de emisión de fluorescencia obtenido en cubeta para el extracto de la muestra adicionada.	73
Figura 3.18. Esquema de tratamiento de datos para la estandarización, calibración y predicción de PMM en muestras de maíz.	75
Figura 3.19. Perfiles de PARAFAC de excitación (A y C) y de emisión (B y D), de la solución de PMM en solvente (línea continua verde) y de la muestra adicionada (PMF: línea continua azul; interferentes de la matriz: líneas punteadas grises).	76
Figura 3.19. EJCR obtenidas para los valores de predicción de muestras adicionadas con PMM, empleando el modelo estandarizado (línea continua negra) y no estandarizado (línea discontinua gris).	79
Figura 3.21. Esquema del instrumento para la generación de los datos.	84
Figura 3.22. Evolución de la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex}=240$ nm/ $\lambda_{em}=390$ nm) de AZM en medio alcalino en función del tiempo de irradiación. Se muestran las EEMs obtenidas a t=0, 2, 4 y 6 min.	89
Figura 3.23. Perfiles espectrales de excitación (A), emisión (B) y temporales (C) obtenidos para soluciones estándares puras y por PARAFAC para una muestra de validación (Perfiles reales: líneas punteadas; perfiles de PARAFAC: líneas continuas. AZM: rojo; BTN: azul; FBZ: celeste; TBZ: verde)	90
Figura 3.24. Perfiles espectrales de excitación (A), emisión (B) y temporales (C) obtenidos para una muestra de durazno adicionada (AZM: línea roja; componentes de la matriz: líneas grises)	94
Figura 3.25. Matriz tiempo-emisión registrada para una mezcla de calibración. En línea continua negra se muestra la señal blanco sustraída de la matriz de datos para la corrección de la línea de base.	104

Figura 3.26. Espectros de excitación (A) y emisión (B) de fluorescencia de los analitos puros: rojo: CBZ, azul: TBZ, verde: FBZ, celeste: CBF, naranja: CBR, amarillo: NFT..... 105

Figura 3.27. Cromatogramas registrados a $\lambda_{ex}=283$ nm y $\lambda_{em}=325$ nm (línea continua negra), 355 nm (línea punteada gris) y 455 nm (línea continua gris) para una muestra de validación (A) y una muestra real adicionada con los 6 analitos (B)... 107

Figura 3.28. Arreglo de datos tiempo-emisión (D_{aum1}) y tiempo-emisión-excitación (D_{aum2}) para el modelado por MCR-ALS, para datos de segundo y tercer orden, respectivamente..... 108

Figura 3.29. Perfiles obtenidos por MCR-ALS de tiempo (A.I y A.II para RI y RII, respectivamente) y espectrales de emisión (B.I y B.II para RI y RII, respectivamente) y excitación (C.I y C.II para RI y RII, respectivamente): rojo: CBZ, azul: TBZ, verde: FBZ, celeste: CBF, naranja: CBR, amarillo: NFT..... 109

Figura 3.30. Vectorización de los datos de tiempo-emisión (Modelo 1) y tiempo-emisión-excitación (Modelo 2) para el modelado por U-PLS, para datos de segundo y tercer orden, respectivamente. 111

Índice de tablas

Tabla 1.1. Parámetros para el cálculo de SEN para diferentes modelos de calibración y orden de datos.....	21
Tabla 3.1. Concentraciones de cada proteína individual en las muestras de calibración	33
Tabla 3.2. Concentraciones de proteína total en las muestras de calibración.....	34
Tabla 3.3. Resultados obtenidos y comparación de dispositivos basados en EC-QCL e instrumentos FT-IR convencionales para mediciones de transmisión IR.....	44
Tabla 3.4. Parámetros del modelado por PLS	48
Tabla 3.5. Resultados de predicciones por EC-QCL/PLS en muestras de validación.....	51
Tabla 3.6. Resultados de predicciones por EC-QCL/PLS y por métodos de referencia en muestras de leche bovina	52
Tabla 3.7. Recuperación de PMM en extractos de los cinco solventes estudiados ...	68
Tabla 3.8. Resultados de predicción por PARAFAC en muestras adicionadas y en una muestra real. Cifras de mérito obtenidas para los dos modelos estudiados.....	77
Tabla 3.9. Resultados de predicciones por PARAFAC y U-PLS/RTL en muestras de validación.....	92
Tabla 3.10. Resultados de predicciones por PARAFAC y U-PLS en muestras reales.....	95
Tabla 3.11. Cifras de mérito analíticas calculadas para las muestras de validación ..	96
Tabla 3.12. Cifras analíticas de mérito calculadas para las muestras reales	96
Tabla 3.13. Resultados de predicción por MCR-ALS y U-PLS para datos de segundo orden en muestras de validación (MV).....	112

Tabla 3.14. Resultados de predicción por MCR-ALS y U-PLS para datos de tercer orden en muestras de validación (MV).....	113
Tabla 3.15. Resultados de predicción por U-PLS en muestras reales	115
Tabla 3.16. Cifras de mérito analíticas obtenidas para muestras de validación y calibración, en el modelado por MCR-ALS y U-PLS (2° orden/3° orden).	117

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Análisis de muestras alimenticias*

El control de calidad de productos en la industria alimentaria, desde la materia prima hasta el producto final, se encuentra en constante crecimiento. Para poder competir en el mercado, las compañías productoras de alimentos deben cumplir con la demanda de los consumidores, atendiendo no sólo a la calidad de los alimentos en cuanto a la composición nutricional y las propiedades sensoriales, sino también a en lo que respecta a la seguridad alimentaria. Esta última se ve reflejada en el aumento en los controles de alérgenos, residuos de plaguicidas y productos de modificaciones genéticas de los alimentos, entre otros.¹

La creciente demanda por parte de consumidores, productores y organismos de regulación nacional e internacional desafía constantemente a la comunidad científica que trabaja en el campo de los alimentos para monitorear la composición de productos alimenticios y asegurar su calidad e inocuidad. Para poder hacerlo, deben prestar especial atención a las regulaciones y pautas gubernamentales y a los estándares y políticas de organizaciones internacionales. Organizaciones tales como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA: Food and Drug Administration), la Comisión de la Unión Europea (UE), la Federación Internacional de Lechería (IDF: International Dairy Federation) o el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (SENASA), entre otros, establecen los niveles aceptables de determinados compuestos en productos alimentarios. En el caso de los residuos de plaguicidas, la Comisión-UE en Europa o SENASA en Argentina establecen el Límite Máximo de Residuo (LMR) que es la máxima concentración de residuo de un plaguicida legalmente permitido, en productos y subproductos de la agricultura. La FDA y la IDF, por su parte, sugieren las concentraciones mínimas de proteínas lácteas presentes en el producto final luego de ser sometido a diferentes tratamientos térmicos o no térmicos.

Por otro lado, es de crítica relevancia la selección del método analítico, que dependerá de la naturaleza de la muestra y el fin específico del análisis. Los factores claves que se tienen en cuenta en la selección del método suelen ser la velocidad de análisis, la precisión, la exactitud y la robustez. Otros factores a tener en cuenta son la sensibilidad y los límites de detección y cuantificación del método, dado los bajos niveles de concentración en los que se encuentran los analitos en las muestras,

especialmente cuando se evalúan, por ejemplo, residuos de plaguicidas o proteínas remanentes luego de intensos tratamientos térmicos. Además, el análisis de muestras alimentarias plantea el desafío de trabajar con matrices de composición compleja y, en algunos casos, desconocida. Teniendo en cuenta esto, las técnicas espectroscópicas acopladas al modelado quimiométrico se presentan como una alternativa que permite sortear determinados inconvenientes que surgen del análisis con métodos tradicionales o de referencia. Entre ellas se pueden mencionar la minimización o eliminación de pasos de tratamiento de muestra, la cuantificación de analitos de interés en presencia de componentes no esperados, el incremento de la sensibilidad y el aumento de la velocidad de análisis.

1.2. *Técnicas espectroscópicas*

Las técnicas de espectroscopia óptica son sensibles y rápidas, por lo que resultan especialmente adecuadas para un amplio rango de aplicaciones en el campo de la física y la química molecular. Las propiedades espectroscópicas como la absorbancia o la fluorescencia pueden dar información de la identidad, concentración, conformación y dinámica de las moléculas, siendo sensibles a pequeños cambios de las estructuras moleculares. Adicionalmente, son técnicas no destructivas que permiten recuperar la muestra luego del análisis.² A continuación, se describen brevemente las técnicas de espectroscopia de absorción infrarroja (IR) y de fluorescencia empleadas en el presente trabajo.

1.2.1. *Espectroscopia de absorbancia infrarroja*

La espectroscopia IR engloba un amplio rango de métodos analíticos que utilizan la región del espectro electromagnético comprendida entre 1 y 250 μm , y puede ser divididas en 3 partes: IR cercano o NIR (1-2.5 μm), IR medio o MIR (2.5-25 μm) e IR lejano o FIR (25-250 μm). La absorción de la radiación IR excita los estados vibracionales de las moléculas cuando la frecuencia de la radiación es igual a la

vibración de la molécula.³ La Figura 1.1 muestra los modos de vibración por estiramiento y flexión de una molécula de tres átomos lineal y no lineal.

Los espectros de absorción IR incluyen múltiples bandas que brindan información acerca de la estructura molecular, pudiéndose asignar las bandas de absorción individuales a determinados grupos de átomos.² La espectroscopia MIR, en particular, tiene gran aplicación en el análisis estructural de proteínas debido a las frecuencias vibracionales características de ciertos grupos funcionales, como las correspondientes al enlace peptídico, denominadas bandas amida I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) y amida II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$).

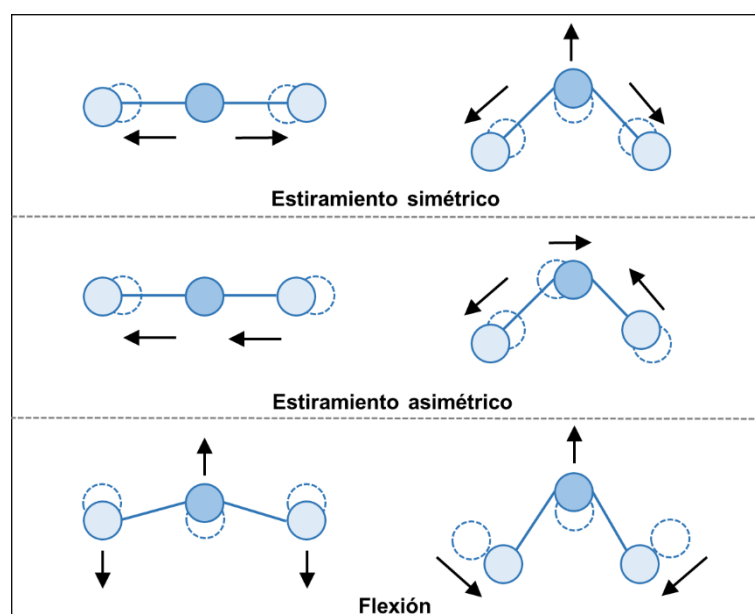


Figura 1.1. Tipos de estiramiento y flexión de una molécula de tres átomos lineal o no lineal.

Los espectrofotómetros de IR más ampliamente empleados se basan en la espectroscopia IR con transformada de Fourier (FT-IR), en la que la señal del detector (intensidad vs tiempo) se convierte a espectro (intensidad vs número de onda) a través de la transformación matemática denominada transformada de Fourier. La espectroscopia FT-IR presenta numerosas ventajas entre las que se pueden mencionar la detección simultánea de un amplio rango espectral, alta velocidad y alta precisión de número de onda, que permite promediar múltiples mediciones consecutivas para cada espectro, reduciendo notablemente el ruido instrumental y mejorando la relación señal-ruido (SNR).⁴ La espectroscopia FT-IR es el método estándar para las mediciones espectrales en la región MIR.⁵

La principal desventaja de la espectroscopia FT-IR es la fuente de radiación lumínica convencional que emplean estos instrumentos que presentan baja energía de emisión, siendo una alternativa las fuentes de radiación láser. Los tipos de láseres que comenzaron a aplicarse recientemente son los láseres de cascada cuántica con cavidad externa (EC-QCL: *External Cavity-Quantum Cascade Lasers*). Los EC-QCL ofrecen una alta densidad de intensidad de emisión en un amplio rango espectral, operando a temperatura ambiente.^{6,7,8} Son láseres unipolares basados en transiciones inter sub-bandas de electrones dentro de bandas de conducción de semi-conductores.⁹ La principal ventaja del uso de EC-QCL es la posibilidad de aplicar longitudes de paso óptico mayores, en comparación a las permitidas por los instrumentos FT-IR, mejorando ampliamente la SNR y permitiendo, por lo tanto, disminuir considerablemente los límites de detección de los analitos determinados mediante esta técnica.

1.2.2. Espectroscopia de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es una herramienta de gran utilidad empleada en diversas disciplinas, especialmente en las ciencias químicas y biológicas. La detección por fluorescencia es altamente sensible y se basa en la emisión de energía lumínica por parte de una sustancia cuando los electrones en estados excitados de una molécula regresan al estado basal.¹⁰

Los espectrofotómetros de fluorescencia comerciales permiten no solo registrar la intensidad de emisión de fluorescencia de un compuesto a determinadas longitudes de onda de excitación y emisión, sino que es posible registrar el espectro completo de emisión del compuesto al excitar a una longitud de onda fija. Adicionalmente, es posible registrar los espectros de emisión para un rango de longitudes de onda de excitación, obteniéndose una matriz de excitación-emisión de fluorescencia (EEM).¹¹ En la Figura 1.2 se pueden visualizar los espectros de excitación y emisión de un compuesto orgánico y la EEM correspondiente. La posibilidad de obtener matrices de datos para una muestra a partir de la señal instrumental generada aporta una serie de ventajas adicionales al método analítico, las que se discutirán en la sección 1.3.

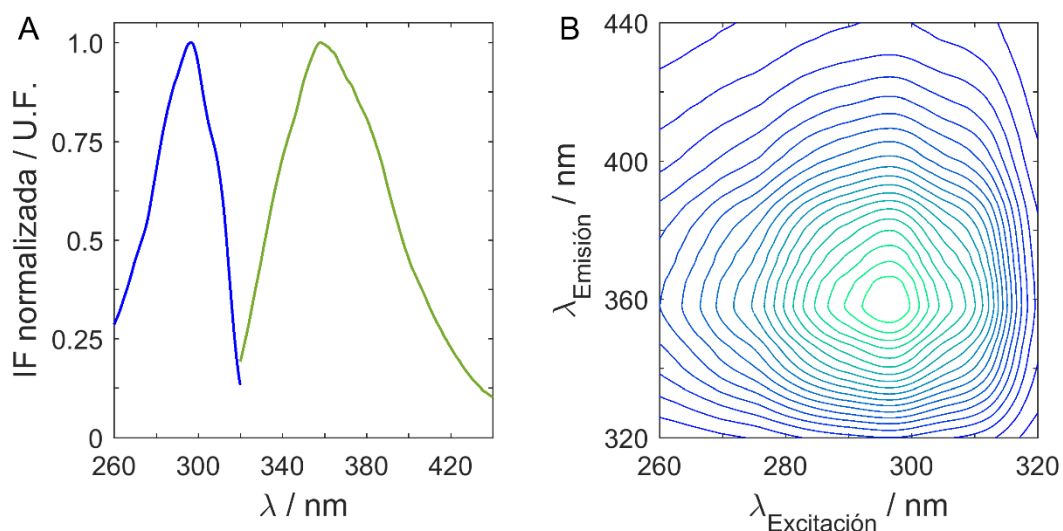


Figura 1.2. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia (A) y matriz de excitación-emisión de fluorescencia (B) de un compuesto orgánico en solución.

Las principales ventajas de la espectroscopia de fluorescencia son la selectividad y la sensibilidad, motivo por el que es aplicada al análisis de analitos en muy bajas concentraciones. Como se explicó anteriormente, la absorción de energía lumínica por parte de una molécula provoca la excitación de sus electrones a estados energéticos mayores. El retorno al estado basal con emisión de energía lumínica da lugar al fenómeno de fluorescencia. Sin embargo, existen otros procesos que llevan a la pérdida de energía sin emisión de luz. Por este motivo, de todos los compuestos orgánicos e inorgánicos conocidos sólo una pequeña fracción exhibe señal de fluorescencia.¹² En consecuencia, a lo largo de los años se han propuesto diversas estrategias que permiten inducir o exaltar la señal de fluorescencia de los compuestos de interés. La fluorescencia en medios organizados, por ejemplo, se basa en el uso de ciclodextrinas o surfactantes, entre otros, para formar complejos con el analito y brindarle un microambiente distinto al cuerpo de la solución. De esta manera, se pueden evitar o minimizar procesos indeseados que llevan a la pérdida de la fluorescencia, o promover un aumento de la señal.^{12,13} Por otro lado, se describen métodos que permiten detectar compuestos no fluorescentes mediante una reacción que permita obtener un derivado fluorescente.¹⁴ Estas reacciones pueden ser llevadas a cabo por irradiación de una solución con luz UV,^{15,16} por hidrólisis^{17,18} o mediante el agregado de un reactivo químico que se une a la molécula de interés confiriéndole propiedades fluorescentes.^{19,20}

1.3. Calibración multivariada

La calibración es un procedimiento que permite obtener la relación entre una cantidad de entrada con una de salida para un sistema dado, bajo determinadas condiciones. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) define a la calibración en el campo de la química analítica como la operación que determina, mediante una función, la relación entre los valores medidos con las cantidades presentes de un analito. La etapa de calibración incluye la selección de un modelo que mejor describa el sistema, la estimación de los parámetros del modelo y sus errores, y la validación.²¹ En el presente contexto, la calibración es el procedimiento mediante el cual se relaciona la señal instrumental obtenida, como por ejemplo la absorbancia o la intensidad de fluorescencia, con la concentración del analito.

Los métodos de calibración pueden clasificarse según el dato instrumental obtenido.²² Por un lado, la calibración univariada es aquella que establece la relación entre un único valor (escalar) de la señal instrumental y la propiedad de un único analito. Por otro lado, la calibración multivariada se da cuando se obtienen múltiples valores correspondientes a la señal instrumental para una misma muestra y el modelo describe la relación entre una propiedad de uno o varios componentes de la muestra con varias respuestas instrumentales.²³

La calibración multivariada presenta ventajas frente a la calibración univariada, siendo la más evidente la determinación simultánea de varios analitos en sistemas multicomponentes. Además, se destacan las ventajas aportadas frente a muestras que presentan compuestos no esperados, denominados interferentes. Por un lado, los métodos de calibración de primer orden presentan la capacidad de detectar muestras anómalas de un conjunto de muestras por las diferencias de composición en relación a las muestras de calibración, llamada ventaja de primer orden. Por otro lado, los métodos de calibración multivariada de segundo orden u orden superior permiten la determinación de analitos en las muestras en presencia de componentes no esperados, lo que se conoce como ventaja de segundo orden. Finalmente, la ventaja de tercer orden, relacionada a la calibración multivariada de tercer orden u orden superior, no ha sido aún establecida en la comunidad científica, aunque algunos autores la definen como la capacidad de resolver un problema complejo en un arreglo de datos correspondiente a una única muestra, independientemente de muestras adicionales, el aumento de la sensibilidad y la selectividad y la resolución de problemas de colinealidad entre señales.²⁴ Además, se ha demostrado que el aumento en el orden de

los datos instrumentales tiene un impacto positivo en las cifras de mérito de los métodos analíticos.²⁵

Los métodos de calibración univariada o multivariada de primer, segundo y tercer orden, u orden superior, se definen como tal de acuerdo al tipo de dato instrumental generado para el análisis. A continuación, se describe en detalle la clasificación de los datos instrumentales y las propiedades de cada uno de ellos.

1.3.1. Clasificación de los datos instrumentales

El tipo de calibración que se aplica para un sistema determinado está condicionado por las dimensiones de los datos instrumentales obtenidos. Es importante remarcar que los datos generados para una sola muestra se clasifican según su orden mientras que los datos generados para un grupo de muestras se clasifican según el número de vías en los que se disponen. De esta distinción se desprende la calibración multivía, dada para datos de segundo orden y órdenes superiores. En la Figura 1.3 se muestra un esquema de la clasificación de los datos instrumentales según el orden (1 muestra) y según el número de vías (I muestras).

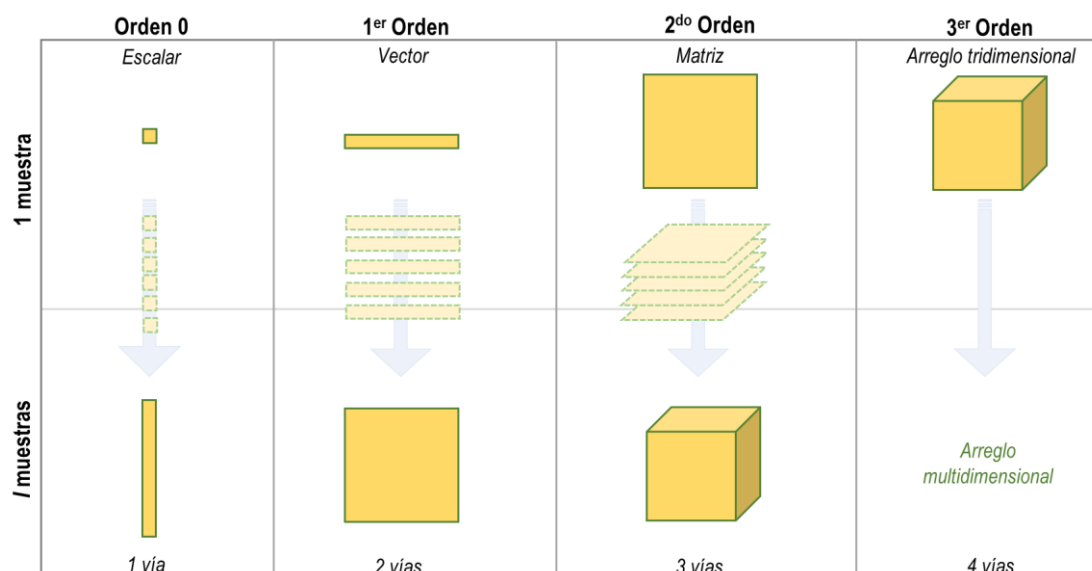


Figura 1.3. Clasificación de los datos instrumentales según sus órdenes y el número de vías de sus arreglos

1.3.1.1. Datos de orden cero

Los datos de orden cero se obtienen con instrumentos que producen una única respuesta por muestra. Ejemplos de este tipo de datos son las señales de absorbancia registradas a una única longitud de onda, el valor del área de un pico cromatográfico de un analito o la lectura de un electrodo ion selectivo. Los datos de orden cero están representados por un escalar de dimensiones 1×1 para una única muestra. Para un conjunto de datos para diferentes muestras, los datos de orden cero se pueden disponer en un arreglo vectorial o arreglo de 1 vía, de dimensiones $J \times 1$, en donde el modo adicional corresponde al número de muestras.

1.3.1.2. Datos de primer orden

Los datos de primer orden son aquellos generados por instrumentos que permiten obtener un arreglo vectorial por muestra, de dimensiones $J \times 1$ para una única muestra. Se pueden mencionar como ejemplos de este tipo de datos a los espectros obtenidos mediante espectroscopia de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) o IR, espectros de emisión de fluorescencia registrados a una única longitud de onda de excitación o señales electroquímicas como voltamperogramas. Para un conjunto de muestras es posible construir un arreglo matricial, o arreglo de 2 vías, de dimensiones $I \times J$.

1.3.1.3. Datos de segundo orden

Los datos de segundo orden son generados por instrumentos que permiten obtener una matriz de datos por muestra analizada, de dimensiones $J \times K$. Se pueden obtener empleando un único instrumento que permita registrar matrices de datos, como, por ejemplo, EEMs medidas con un espectrofluorímetro o espectros de absorción UV-Vis a lo largo de una cinética de reacción registrados con un espectrofotómetro UV-Vis, o mediante el acoplamiento de dos instrumentos de primer orden, como, por ejemplo, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Cuando los datos de segundo orden para un grupo de muestras se juntan en un único arreglo matricial, el objeto resultante se conoce como arreglo de 3 vías, de dimensiones $I \times J \times K$.

1.3.1.4. Datos de tercer orden

Los datos de tercer orden son los generados al introducir una dimensión extra en los datos, obteniéndose un arreglo tridimensional de dimensiones $J \times K \times L$. Esta clase de datos se puede obtener, por ejemplo, monitoreando una reacción cinética con espectroscopia de excitación-emisión de fluorescencia o con un cromatógrafo con detección de excitación-emisión de fluorescencia.

Los datos de tercer orden pueden agruparse para un grupo de muestras en un único arreglo multidimensional, resultando en un arreglo de 4 vías de dimensiones $I \times J \times K \times L$.

1.3.2. *Propiedades de los datos multidimensionales*

Una etapa importante en la calibración multivía es la selección del algoritmo de calibración, para lo que resulta indispensable conocer las propiedades de los datos que serán modelados. En la calibración univariada clásica, por ejemplo, es importante saber si la señal tiene un comportamiento lineal con respecto a la concentración del analito antes de seleccionar un modelo de regresión lineal o no lineal para llevar a cabo el ajuste de los datos. De manera análoga, para los datos multidimensionales también es necesario hacer un análisis del comportamiento de la señal.

Para datos de segundo orden, la señal instrumental obtenida para un compuesto puro, en ausencia de ruido, se puede expresar como el producto de dos vectores correspondientes a cada modo instrumental, según la Ecuación 1:

$$\mathbf{X} = \mathbf{b} \mathbf{c}^T$$

Ecuación 1

en donde \mathbf{X} es una matriz de datos ($J \times K$), \mathbf{b} un vector columna con J filas ($J \times 1$) y \mathbf{c} un vector columna con K filas ($K \times 1$). El superíndice T indica la transpuesta de una matriz, por lo que \mathbf{c}^T será un vector fila con K columnas ($1 \times K$).

En una muestra de N componentes, la matriz de datos \mathbf{X} puede expresarse como la sumatoria de las contribuciones individuales de cada componente puro, es decir:

$$\mathbf{X} = \sum_{n=1}^N \mathbf{b}_{jn} \mathbf{c}_{kn}^T = \mathbf{B} \mathbf{C}^T$$

Ecuación 2

en donde **B** es una matriz ($J \times N$) conteniendo los perfiles de uno de los modos instrumentales de cada n componente y \mathbf{C}^T una matriz ($N \times K$) conteniendo los N perfiles del modo instrumental restante. Este tipo de datos se denomina bilineal, es decir, lineal en una variable cuando la otra está fija y viceversa.

Cuando una matriz de datos se agrupa en un arreglo de tres vías, la resultante se puede expresar como:

$$x_{ijk} = a_i b_j c_k$$

Ecuación 3

donde x_{ijk} es un elemento del arreglo **X** de tres vías de dimensiones $I \times J \times K$ y a_i , b_j y c_k son los elementos de los perfiles de una dimensión **a**, **b** y **c** que describen el comportamiento de la señal medida en cada una de las dimensiones de los datos. En este caso el arreglo de datos se conoce como trilineal, indicando que existe una relación interna entre cada una de las matrices y que, en general, la descomposición de estos arreglos es única.^{26,27}

1.3.3. Algoritmos quimiométricos

Un algoritmo es un procedimiento condensado en una serie de instrucciones para llevar a cabo una tarea computacional que permite hallar la solución a un problema.²⁸ Existe un gran número de algoritmos que pueden emplearse para el análisis de datos, y la selección del adecuado está sujeta al tipo de dato obtenido y al propósito del análisis.

Los datos de orden cero se modelan por calibración univariada mediante un ajuste por cuadrados mínimos y requieren de completa selectividad para el analito de interés.²¹

Para datos de primer orden, la relación entre la señal instrumental y la concentración de los analitos es modelada usando estructuras bilineales que son combinaciones lineales de los perfiles reales y no presentan interpretación física alguna. El modelado se basa en la presunción de que el sistema o proceso que está siendo investigado se encuentra influenciado, fundamentalmente, por solo algunas variables denominadas variables latentes.²⁹ De esta manera, la falta de selectividad es compensada extrayendo de la señal instrumental obtenida una porción que contiene la información relevante del sistema. Los algoritmos más empleados son la regresión en componentes principales (PCR: *Principal Component Regression*) y los cuadrados mínimos parciales (PLS: *Partial Least Squares*). Existen, además, algoritmos que se emplean cuando los datos presentan un comportamiento no lineal, como los basados en redes neuronales artificiales (ANN: *Artificial Neural Networks*) o las máquinas de vectores soportes acopladas a ajuste por cuadrados mínimos (LS-SVM: *Least Square-Support Vector Machine*). Los algoritmos de primer orden presentan la ventaja de primer orden anteriormente mencionada, por lo que permiten la identificación de muestras incógnita que presentan componentes no esperados, es decir que no fueron modelados en la etapa de calibración. La muestra es considerada como anómala debido a que los residuos espectrales son extraordinariamente grandes en comparación con el ruido instrumental.²²

El análisis de los datos de segundo orden se puede llevar a cabo mediante la selección del algoritmo adecuado dentro de una amplia variedad disponible. Entre los más empleados se encuentra el análisis paralelo de factores (PARAFAC: *Parallel Factor Analysis*) y sus variantes,²⁶ la resolución multivariada de curvas acoplada a cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS: *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares*)³⁰ y la descomposición trilineal alternante (ATLD: *Alternating Trilinear Decomposition*) y sus variantes,³¹ entre otros. Estos algoritmos cobran mayor importancia en el análisis de mezclas complejas debido a que cuentan con la ventaja de segundo orden. Además, los perfiles obtenidos de la descomposición tienen interpretación física y pueden ser relacionados con propiedades físico-químicas del sistema, por lo que pueden ser aplicados al análisis cuantitativo y cualitativo.

Por otro lado, los algoritmos como cuadrados mínimos parciales desdoblados (U-PLS: *Unfolded – Partial Least Squares*) o cuadrados mínimos parciales multivía (N-PLS: *N-way Partial Least Squares*) acoplados a procedimientos de bilinearización residual (RBL: *Residual Bilinearization*) pueden ser aplicados para análisis cuantitativo debido a que los perfiles obtenidos no tienen interpretación física.³²

Por último, para el análisis de datos de tercer orden se pueden aplicar las metodologías descritas para los datos de segundo orden utilizando modelos de

estructuras latentes, como U-PLS acoplada a trilinearización residual (RTL: *Residual Trilinearization*) o N-PLS/RTL, o métodos como PARAFAC, PARAFAC aumentado (APARAFAC: *Augmented PARAFAC*) o MCR-ALS con datos de 4-vías desdoblados y aumentados. A continuación se desarrollarán en detalle los algoritmos utilizados en esta tesis: PLS, U-PLS/RBL-RTL, MCR-ALS y PARAFAC.

1.3.3.1. PLS y U-PLS

El modelado de datos de primer orden por PLS consiste fundamentalmente en dos etapas. La primera es la etapa de calibración en la que se emplea la señal obtenida de las I muestras de calibración, contenida en una matriz \mathbf{X}_c ($J \times I$), y la información de concentración de dichas muestras, contenida en un vector \mathbf{y} ($I \times 1$). En esta primera etapa no se tienen en cuenta los datos correspondientes a las muestras desconocidas. El procedimiento permite obtener una matriz de cargas \mathbf{P} (*loadings*), de $J \times A$, y una matriz de puntuaciones \mathbf{T} (*scores*), de $I \times A$ en donde A representa el número de variables latentes, y los coeficientes de regresión \mathbf{v} de $A \times 1$. El número de variables latentes A usualmente se selecciona mediante procedimientos de validación cruzada. El modelo PLS puede expresarse de la siguiente manera:

$$\mathbf{X}_c = \mathbf{P} \mathbf{T}^T$$

Ecuación 4

La segunda etapa es la de predicción, en la que la señal de la muestra \mathbf{X}_u es reemplazada por los *scores* de la muestra \mathbf{t}_u , obtenidos por proyección de los datos en el espacio de las variables latentes, y la concentración del analito en la muestra de interés pueden predecirse utilizando la siguiente ecuación:

$$y_n = (\mathbf{t}_{u_A})^T \mathbf{v}_n$$

Ecuación 5

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \mathbf{x}_u$$

Ecuación 6

en donde \mathbf{W} son los pesos de carga (*weight loadings*) estimados a partir de las muestras de calibración.

Cuando se trabaja con datos de segundo o tercer orden se emplea PLS desdoblado, o U-PLS, en el que el primer paso consiste en la vectorización de los datos matriciales o los arreglos tridimensionales obtenidos, tanto para las muestras de calibración (\mathbf{Z}_c) como para las empleadas en la etapa de predicción (\mathbf{Z}_u).

$$\mathbf{Z}_c = [\text{vec}(\mathbf{X}_{c,1}) \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{c,2}) \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{c,3}) \mid \dots \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{c,I})]$$

Ecuación 7

$$\mathbf{Z}_u = [\text{vec}(\mathbf{X}_{u,1}) \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{u,2}) \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{u,3}) \mid \dots \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{u,I})]$$

Ecuación 8

A continuación, el procedimiento es el mismo que el descrito para datos de primer orden.

Es importante notar que cuando las muestras incógnitas contienen componentes no esperados, los *scores* obtenidos para la muestra generarán residuos extraordinariamente grandes en comparación con el ruido instrumental. Cuando los datos analizados son de primer orden, estas muestras se detectan como anómalas y la concentración del analito no puede ser determinada. Sin embargo, si los datos son de segundo o tercer orden, el problema puede ser resuelto mediante modelado del efecto de los componentes no esperados en la muestra.

Cuando existen componentes no calibrados en la matriz de datos \mathbf{X}_u , los *scores* de la muestra obtenidos con la Ecuación 6 no son adecuados para realizar la predicción del analito a través de la Ecuación 5. Una manera de detectar la presencia de componentes no calibrados es mediante inspección de los residuos de U-PLS de la muestra, calculados a partir de la Ecuación 9:

$$s_{\text{UPLS}} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P}\mathbf{t}_u\| / (JK - A)^{1/2}$$

Ecuación 9

donde $\|\cdot\|$ indica la norma Euclidea.

Si hay interferencias en las muestras, s_{UPLS} resultará anormalmente grande debido a que el producto $(\mathbf{P}\mathbf{t}_u)$ no logra reconstruir correctamente el vector de la muestra $\text{vec}(\mathbf{X}_u)$. Para resolver el problema se aplica el procedimiento de RBL que busca eliminar de los datos originales los efectos atribuidos a componentes no esperados de la muestra, y se basa en la transformación de los residuos en un arreglo bilineal y el análisis por componentes principales (PCA: *Principal Component Analysis*)³³ de la matriz obtenida. Dada una matriz de datos de una muestra que contiene componentes no calibrados, su señal puede ser descompuesta en dos partes: una que puede ser explicada con las variables latentes del modelo de calibración y otra que contiene el efecto de los interferentes, que puede ser modelada con un cierto número de componentes principales (N_{RBL}):³⁴

$$\mathbf{X}_u = \mathbf{P}\mathbf{t}_{\text{RBL}} + \mathbf{B}_{\text{RBL}} \mathbf{T}_{\text{RBL}}^T + \mathbf{E}_{\text{RBL}}$$

Ecuación 10

En la Ecuación 10, el término $(\mathbf{B}_{\text{RBL}} \mathbf{T}_{\text{RBL}}^T)$ es el modelo PCA obtenido para el residuo $(\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P}\mathbf{t}_{\text{RBL}})$ con N_{RBL} componentes principales. Inicialmente, el residuo $(\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P}\mathbf{t}_{\text{RBL}})$ contiene la contribución tanto de los componentes calibrados como de los interferentes. El modelado con PCA permite extraer los componentes N_{RBL} y, en la medida que este número mejor represente a las interferencias presentes en la muestra, el producto $(\mathbf{P}\mathbf{t}_{\text{RBL}})$ logrará reproducir más adecuadamente el comportamiento de los analitos en la muestra, llevando a la disminución del residuo \mathbf{E}_{RBL} .

Una vez minimizado el residuo \mathbf{E}_{RBL} mediante el procedimiento de Gauss-Newton, se obtienen los *scores* finales \mathbf{t}_{RBL} con los que se pueden obtener las predicciones de concentración de los analitos en la muestra, reemplazando \mathbf{t} por \mathbf{t}_{RBL} en la Ecuación 5.

Para datos de tercer orden se aplica una extensión del procedimiento RBL denominado RTL.

1.3.3.2. MCR-ALS

El algoritmo MCR-ALS es una herramienta quimiométrica ampliamente utilizada para resolver respuestas de múltiples componentes en mezclas desconocidas.³⁵ Esta técnica permite extraer información de un sistema multicomponente mediante la discriminación de las contribuciones individuales de cada uno de los constituyentes de la mezcla. La premisa básica de MCR es la validez de la Ley de Lambert-Beer para el sistema espectroscópico analizado. De esta manera, los perfiles de los componentes puros obtenidos adquieren significado químico y pueden ser directamente interpretados como perfiles de concentración y espectros.³⁶

MCR-ALS presenta la capacidad de procesar múltiples matrices de datos simultáneamente reduciendo ambigüedades intrínsecas del análisis de factores y/o deficiencias de rango presentes en los datos. Se considera que una matriz es deficiente de rango cuando el número de contribuciones químicas detectadas por los métodos de análisis de factores, como por ejemplo descomposición por valores singulares (SVD: *Singular Value Decomposition*), es menor que el número de componentes químicos presentes en el sistema, lo que puede deberse a similitudes muy marcadas entre los espectros o los perfiles de concentración de las especies que intervienen.³⁷ Por otra parte, este algoritmo permite la aplicación flexible y diversa de restricciones que ayudan a la resolución, mejorando los resultados.

Matemáticamente, el modelo puede describirse como la descomposición bilineal dada por la ecuación:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}$$

Ecuación 11

en donde \mathbf{D} ($K \times J$) contiene el total de las señales instrumentales obtenidas para la muestra, \mathbf{C} ($K \times N$) y \mathbf{S} ($J \times N$) contienen los perfiles de concentración y espectrales puros, respectivamente, de los N componentes de la muestra y \mathbf{E} representa la contribución del error. Para el análisis de múltiples muestras es posible generar una matriz aumentada \mathbf{D}_{aum} agrupando las matrices individuales de cada muestra en el sentido de las columnas o de las filas. En general, cuando los datos presentan pérdida de trilinealidad se pueden modelar por MCR aumentando la matriz en el sentido del modo que rompe la trilinealidad. Por ejemplo, los datos cromatográficos en los que los picos presentan corrimientos en los tiempos de retención y/o deformaciones entre muestra y

muestra pueden resolverse aumentando la matriz en el sentido de los tiempos cromatográficos.

La descomposición de **D** se logra a través de un método iterativo basado en la minimización por cuadrados mínimos alternantes (ALS) de la norma de **E**. La minimización comienza con estimaciones de las matrices **C** y **S**, denominadas $\hat{\mathbf{C}}$ y $\hat{\mathbf{S}}$, y continúa con el cálculo iterativo de **C** y **S** según:

$$\hat{\mathbf{S}} = \mathbf{C}^+ \mathbf{D} = (\hat{\mathbf{C}}^T \hat{\mathbf{C}})^{-1} \hat{\mathbf{C}}^T \mathbf{D}$$

Ecuación 12

$$\hat{\mathbf{C}} = \mathbf{D} \hat{\mathbf{S}}^{T+} = \hat{\mathbf{S}} \mathbf{D} (\hat{\mathbf{S}}^T \hat{\mathbf{S}})^{-1}$$

Ecuación 13

en donde + indica la pseudoinversa de una matriz. El cálculo continúa hasta alcanzar la convergencia imponiendo ciertas restricciones adecuadas al sistema en estudio durante el proceso de ALS. Entre las restricciones más empleadas se pueden mencionar las siguientes:³⁸

No-Negatividad: fuerza a los perfiles a tener valores nulos o positivos. Se aplica a perfiles de concentración o a respuestas instrumentales, como espectros de absorción o de fluorescencia, que por su naturaleza no pueden ser negativos.

Unimodalidad: fuerza la presencia de un único máximo en el perfil de una especie. Se aplica a procesos en donde los perfiles de concentración muestran una forma de aparición-decaimiento (perfiles de reacción, picos cromatográficos o electroforéticos, voltamogramas).

Sistema cerrado: se relaciona con ecuaciones de balance de masa en sistemas cerrados. Se aplica cuando la concentración total de las especies detectables en cada etapa del proceso es constante, pudiéndose fijar a un valor único o variable. Cuando hay especies no-absorbentes en el sistema no se puede aplicar debido a que las especies que contribuyen a la señal medida no forman un sistema cerrado.

Modelado rígido (Hard-Modelling): se aplica cuando se conoce la ley química (cinética o termodinámica) asociada a un proceso particular. Los perfiles de concentración asociados a componentes en el proceso se fuerzan a presentar la forma descrita por la ley química.

Trilinealidad: es la restricción de tres vías más esencial ya que, cuando es aplicable, asegura que los resultados son únicos; en otras palabras, que los perfiles resueltos no tienen ambigüedad.

Correspondencia entre especies: es aplicable para el análisis de múltiples muestras en un arreglo de 2 vías aumentado. Se establece la presencia o ausencia de un componente en una matriz particular **C** y/o **S**. La información presencia/ausencia se aplica como código binario de 1 y 0, respectivamente.

Finalmente, es importante destacar la importancia de seleccionar parámetros del sistema lo más cercanos posibles al resultado final para la inicialización de MCR-ALS. Se pueden proveer, por ejemplo, espectros de las especies obtenidos a partir de sus estándares puros o del análisis de los llamados espectros "más puros" a través de la metodología SIMPLISMA (*Simple Interactive Self-Modelling Mixture Analysis*), un algoritmo de resolución multivariada de curvas que extrae los espectros puros de los componentes a partir de una mezcla de espectros de composición variada.³⁹

1.3.3.3. PARAFAC

PARAFAC es un algoritmo para datos multivariados de segundo orden y órdenes superiores que consiste en la descomposición de los arreglos de datos en juegos de *loadings* y *scores*, describiéndolos de manera condensada en comparación al dato original.²⁶ El algoritmo PARAFAC es ampliamente utilizado en el análisis quimiométrico debido, entre otras razones, a su propiedad de unicidad, que implica que los datos en concordancia con este modelo pueden ser descompuestos en sus contribuciones individuales de una manera única.⁴⁰ De esta manera, PARAFAC es capaz de resolver matemáticamente, por ejemplo, problemas de solapamiento espectral proporcionando los perfiles espectrales que se relacionan directamente con los reales. Por tal motivo, es un algoritmo que permite el análisis tanto cuantitativo como cualitativo de los sistemas en estudio.

Considerando un arreglo de tres vías **X** de dimensiones $I \times J \times K$, que sigue un comportamiento trilineal, el modelo PARAFAC estará dado por tres matrices **A**, **B** y **C** con elementos \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n y \mathbf{c}_n que incluyen, respectivamente, la concentración relativa o *scores* ($I \times 1$), los perfiles en un sentido ($J \times 1$) y los perfiles en el otro sentido ($K \times 1$), para cada uno de los N componentes que la conforman. El modelo se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\underline{\mathbf{X}} = \sum_{n=1}^N \mathbf{a}_n \otimes \mathbf{b}_n \otimes \mathbf{c}_n + \underline{\mathbf{E}}$$

Ecuación 14

en donde \otimes indica el producto de Kronecker, N es el número total de componentes y $\underline{\mathbf{E}}$ contiene los residuos no ajustados por el modelo.

El modelo descrito por la Ecuación 14 permite obtener los perfiles espectrales (**B** y **C**) y de concentración (**A**) de los componentes individuales de las I muestras, a partir de la descomposición de $\underline{\mathbf{X}}$. Esto es posible aún si los componentes son químicamente desconocidos, constituyendo la base de la ventaja de segundo orden.

El algoritmo más ampliamente empleado para obtener la solución del modelo es cuadrados mínimos alternantes (ALS). El ajuste se realiza asumiendo como conocidos los *loadings* en dos sentidos y estimando los parámetros desconocidos del tercer *loading*, y así sucesivamente hasta alcanzar la convergencia.

Con el objetivo de obtener las concentraciones absolutas de analito se realiza una calibración adecuada, preparando un juego de estándares de composición conocida. La descomposición se realiza para las I muestras de calibración más la muestra incógnita a través de un arreglo de tres vías de $(I+1) \times J \times K$, obteniéndose los valores relativos de **A** mediante la descomposición del arreglo de datos de tres vías.

Una vez realizado el ajuste, la concentración de la muestra incógnita se puede obtener mediante una curva de calibración pseudounivariada, a través de la regresión entre los primeros I elementos de \mathbf{a}_n en función de las concentraciones conocidas de los estándares de calibración. Es importante remarcar que la descomposición por PARAFAC incluye tanto a las muestras de calibración como a la muestra incógnita, y la información de la concentración se adiciona posteriormente en el paso de la calibración pseudounivariada.

1.3.4. Cifras de mérito analíticas

Las cifras de mérito son parámetros numéricos que permiten caracterizar el desempeño de un sistema o dispositivo en relación a otro alternativo. En química analítica se emplean para comparar el desempeño relativo de diferentes metodologías

y para establecer capacidad de detección, una característica de especial interés en la química analítica.^{25,41}

La sensibilidad (SEN) es un parámetro clave, a partir del cual es posible estimar otras cifras de mérito, como la sensibilidad analítica, la selectividad y los límites de detección (LOD: *Limit of detection*) y cuantificación (LOQ: *Limit of quantitation*). La SEN en la calibración univariada fue definida por la IUPAC como el cociente entre el cambio en la respuesta de un instrumento y la variación correspondiente de la concentración del analito, es decir, la pendiente de la curva de calibración.²¹ En la calibración multivariada, la definición de SEN resulta más compleja, especialmente en sistemas multicomponentes. Así, surge una nueva metodología alternativa para estimar la SEN, en la que se considera la propagación de la incertidumbre de la señal instrumental y de la concentración predicha, permitiendo condensar todas las posibles expresiones de SEN en una única ecuación matemática general que contempla los diferentes grados de complejidad que puedan tener los datos.²⁵ La expresión general de SEN es la siguiente:

$$SEN = \{ \mathbf{g}_n^T [\mathbf{Z}_{\text{esp}}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{noesp}} \mathbf{Z}_{\text{noesp}}^+) \mathbf{g}_n] \}^{1/2}$$

Ecuación 15

en donde cada parámetro dependerá del orden de los datos y del modelo matemático empleado, según se detalla en la Tabla 1.1. La matriz \mathbf{Z}_{esp} y el vector especial de la identidad del analito, \mathbf{g}_n , corresponden a la fase de calibración, en los que el subíndice "esp" refiere a componentes esperados. La matriz \mathbf{Z}_{esp} colecta los perfiles de los constituyentes presentes en la muestra de calibración y el vector \mathbf{g}_n selecciona o combina esta información haciéndola específica para el constituyente de interés n. El factor final de la ecuación, $(\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{noesp}} \mathbf{Z}_{\text{noesp}}^+)$, es la manifestación matemática de la ventaja de segundo orden y solo aparece en metodologías de calibración de segundo orden u orden superior.

Tabla 1.1. Parámetros para el cálculo de SEN para diferentes modelos de calibración y orden de datos.

Modelo	Orden	Parámetro			Detalle
		\mathbf{g}_n	\mathbf{Z}_{esp}	$\mathbf{Z}_{\text{noesp}}$	
Univariado	0	1	m_n	-	m_n = pendiente de la curva univariada
PLS	1	$\mathbf{q}_{\text{PLS},n}$	\mathbf{W}_{PLS}	-	$\mathbf{q}_{\text{PLS},n} = (\mathbf{P}_{\text{PLS}}^T \mathbf{W}_{\text{PLS}})^{-1} \mathbf{v}_{\text{PLS},n}^T$ $\mathbf{v}_{\text{PLS},n}$ = coeficientes de regresión de PLS \mathbf{W}_{PLS} = pesos de la calibración de PLS \mathbf{P}_{PLS} = <i>loadings</i> de la calibración de PLS
MCR-ALS	2	δ_n	$(m_n/J^{1/2}) \mathbf{C}_{\text{esp}}$	$\mathbf{C}_{\text{noesp}}$	δ_n = vector Kronecker del analito n m_n = pendiente de la curva pseudounivariada J = numero de sensores de cada submatriz de la matriz aumentada \mathbf{D}_{aum} \mathbf{C}_{esp} = perfiles en modo no aumentado de los constituyentes esperados en las muestras de calibración $\mathbf{C}_{\text{noesp}}$ = perfiles en modo no aumentado de los constituyentes no esperados
PARAFAC	2,3,...	δ_n			2 ^{do} Orden: $\mathbf{Z}_{\text{esp}} = m_n \mathbf{C}_{\text{esp}} \odot \mathbf{B}_{\text{esp}}$ 3 ^{er} Orden: $\mathbf{Z}_{\text{esp}} = m_n \mathbf{D}_{\text{esp}} \odot \mathbf{C}_{\text{esp}} \odot \mathbf{B}_{\text{esp}}$ \mathbf{B}_{esp} , \mathbf{C}_{esp} y \mathbf{D}_{esp} son los <i>loadings</i> de los constituyentes esperados obtenidos para cada modo
U-PLS/RML ^a	2,3,...	$\mathbf{v}_{\text{UPLS},n}$	\mathbf{P}_{UPLS}		$\mathbf{v}_{\text{UPLS},n}$ = coeficientes de regresión de U-PLS \mathbf{P}_{UPLS} = <i>loadings</i> de la calibración de U-PLS

^a RML: multilinearización residual (incluye RBL y RTL)

En cuanto a la selectividad (SEL), el modo más simple de definirla para diferentes tipos de calibraciones es como la relación adimensional entre dos valores de sensibilidad para un analito: la sensibilidad en una mezcla y la sensibilidad cuando todos los demás componentes están ausentes, según la Ecuación 16:

$$\text{SEL} = \text{SEN}_{n, \text{mezcla}} / \text{SEN}_{n, \text{puro}}$$

Ecuación 16

En la calibración univariada la SEL es igual a 1, debido a la ausencia de interferencias. Es relevante destacar que para modelos de calibración multivariada estructurados en variables latentes no es posible obtener aproximaciones de los perfiles de analitos puros y, por lo tanto, la SEL no puede ser definida.

Por otro lado, los LOD y LOQ también pueden ser estimados a partir de la SEN, mediante las siguientes ecuaciones:

$$LOD_n = 3.3 \left(SEN_n^{-2} \sigma_x^2 + h_0 SEN_n^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_{y_{cal}}^2 \right)^{1/2}$$

Ecuación 17

$$LOQ_n = 10 \left(SEN_n^{-2} \sigma_x^2 + h_0 SEN_n^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_{y_{cal}}^2 \right)^{1/2}$$

Ecuación 18

para una distribución t no central con $\nu = n - 2$ grados de libertad y una probabilidad del 95 % ($\alpha = 0.05$), en donde el subíndice n indica el analito de interés y h_0 es el *leverage* de una muestra blanco, un parámetro adimensional que indica la posición de la muestra en el espacio de calibración y que depende, para la calibración multivariada, de la presencia y el nivel de otros constituyentes de la muestra.

En el caso de la calibración multivariada por PLS, Allegrini et al.⁴² propusieron una expresión de un intervalo de LOD y LOQ, en lugar de un único valor, teniendo en cuenta la variación de la composición de la muestra en el espacio de calibración y definiendo dos valores de *leverage*, h_{0min} y h_{0max} . La introducción de estos valores en la Ecuación 17 y la Ecuación 18 permite obtener los LOD_{min} , LOD_{max} , LOQ_{min} y LOQ_{max} . Estos valores pueden ser informados para un conjunto de muestras dado y caracterizar el modelo global, y no solo para una muestra específica.

Por último, dos cifras de mérito importantes para evaluar la calidad de los resultados, cuando se informan valores de predicción, son el error cuadrático medio de predicción (RMSEP) y el error relativo de predicción (REP). Estos parámetros se calculan de la siguiente manera:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (c_{nom, n} - c_{pred, n})^2}{N}}$$

Ecuación 19

$$\text{REP (\%)} = 100 \frac{\text{RMSEP}}{\bar{c}_{\text{cal}}}$$

Ecuación 20

donde $c_{\text{nom},n}$ y $c_{\text{pred},n}$ son las concentraciones nominales y predichas en las N muestras, N es el número de muestras y \bar{c}_{cal} es el valor medio de concentración de las muestras de calibración.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Generación de datos de primer orden y orden superior empleando técnicas cromatográficas, con detección de arreglo de diodos o de fluorescencia de barrido rápido, y espectroscópicas, y su posterior modelado con algoritmos quimiométricos para el desarrollo de métodos aplicados al análisis de plaguicidas y proteínas en productos alimenticios.

2.2. Objetivos específicos

Generar datos de primer, segundo y tercer orden utilizando técnicas separativas y espectroscópicas y modelarlos empleando algoritmos quimiométricos apropiados.

Generar datos de primer orden usando espectroscopia laser infrarroja de última generación para el análisis de proteínas en muestras de leche bovina.

Generar datos de segundo orden empleando espectroscopia de fluorescencia para el análisis de residuos de plaguicidas en granos de maíz. Estudiar la exaltación de la emisión de fluorescencia mediante agregado de medios organizados, como ciclodextrinas o surfactantes.

Generar datos de segundo y tercer orden mediante cinética de degradación inducida por luz, registrando matrices de excitación-emisión de fluorescencia, para el análisis de residuos de plaguicidas en frutas.

Generar datos de segundo y tercer orden empleando cromatografía líquida acoplada a detección de fluorescencia de barrido rápido para el análisis de residuos pesticidas en frutas.

Estudiar el efecto matriz producido por las muestras de composición compleja analizadas y proponer estrategias analíticas y quimiométricas que permitan superar la problemática.

Investigar las propiedades de los algoritmos quimiométricos para el procesamiento de los diferentes tipos de datos generados y analizar las mejoras en las cifras de mérito analíticas obtenidas al aumentar el orden de los datos.

Análisis de productos alimenticios mediante generación y modelado de datos multidimensionales

3. ANÁLISIS DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS MEDIANTE GENERACIÓN Y MODELADO DE DATOS MULTIDIMENSIONALES

3.1. Análisis de proteínas en leche bovina mediante espectroscopia láser infrarroja

3.1.1. Consideraciones generales

La leche es considerada como uno de los alimentos más completos desde el punto de vista nutricional, con una producción global anual de 818×10^6 ton, de las cuales el 84% corresponde a leche bovina.⁴³ Está compuesta principalmente por agua, lípidos, lactosa y proteínas, con un contenido total de proteínas de $\sim 32 \text{ g L}^{-1}$ para leche bovina. La caseína (Cas) representa aproximadamente el 80% del contenido proteico total y el 20% restante se compone de proteínas séricas, siendo la β -lactoglobulina (β -LG) y la α -lactalbúmina (α -LA) las más abundantes en leche cruda, con concentraciones aproximadas de 3.5 g L^{-1} y 1.2 g L^{-1} , respectivamente.⁴⁴

La leche disponible en el mercado se encuentra sometida a diferentes pasos de procesamiento térmico que afectan parámetros como el tiempo de almacenamiento, la composición nutricional y las características organolépticas. Actualmente, los tipos de leche comercialmente disponibles son la leche pasteurizada, la de vida útil extendida (ESL: *Extended Shelf Life*) y la de ultra-alta temperatura (UAT). La leche pasteurizada

recibe el tratamiento térmico más leve (72°C durante 15 s) y puede ser almacenada a 2-8°C durante 10 días.^{45,46} En los últimos años, la leche ESL ha ganado gran aceptación debido al mayor tiempo de almacenamiento permitido en comparación con la leche pasteurizada (21-24 días refrigerada), manteniendo las propiedades nutricionales y de sabor comparables con las de los alimentos frescos.⁴⁷ Las condiciones de procesamiento para la producción de leche ESL pueden ser clasificadas en tratamientos térmicos y no térmicos. El tratamiento no térmico corresponde a métodos de procesamiento suaves, como la bacto-fugación o centrifugación y la micro-filtración. Los tratamientos térmicos, por su parte, incluyen el procesamiento a alta temperatura, sin alcanzar las condiciones extremas del procesamiento UAT. El procesamiento térmico que se emplea para producir leche ESL corresponde a la pasteurización continua o relámpago (HTST: *High Temperature Short Time*), en la que se somete la muestra a altas temperaturas durante un período de tiempo breve (125°C durante 2-3 s). Dos tipos de tratamientos pueden ser aplicados para la producción de leche ESL HTST. En el procesamiento térmico directo, la leche es calentada rápidamente mediante contacto directo con vapor seco, mientras que el indirecto emplea intercambiadores de calor. Las menores velocidades de calentamiento y enfriamiento a las cuales son sometidas las muestras durante el método indirecto inducen mayores cambios químicos en la leche, en comparación con el método directo.^{46, 48} Finalmente, la leche UAT se trata con altas temperaturas (135°C por no menos de 1 s), lo que introduce un sabor a cocción característico, pudiendo ser almacenada a temperatura ambiente durante 6 meses.⁴⁸

La exposición a procesos térmicos intensivos afecta la calidad del producto final y conlleva modificaciones tanto químicas (productos de reacción de Maillard o cambios estructurales de proteínas) como nutricionales (pérdida de vitaminas y desnaturalización de proteínas). El análisis de ciertos indicadores que son afectados durante el tratamiento térmico (formación o degradación) permite una evaluación directa y cuantitativa del impacto de la temperatura, sin conocimiento previo del tipo de tratamiento al que fue sometida la muestra.⁴⁹ La leche bovina presenta múltiples componentes sensibles a la temperatura que pueden ser empleados como indicadores del tratamiento térmico, entre ellos las proteínas β -LG y α -LA. La desnaturalización comienza a, aproximadamente, 60°C para β -LG y 75°C para α -LA, por lo que la concentración de la fracción de dichas proteínas desnaturalizadas remanente en el producto final puede ser considerada como un indicador de la temperatura a la cual fue sometido en el tratamiento y para distinguir entre diferentes tipos de leche.⁵⁰ La Federación Internacional de Lechería (IDF) propone un mínimo contenido de β -LG de 2.6 mg mL⁻¹ para leche pasteurizada y de 0.05 mg mL⁻¹ para leche UAT.⁵¹ Para la leche ESL, los valores límites no son obligatorios en la actualidad.

Actualmente, el método analítico estándar para la determinación del contenido proteico total en leche es el tradicional método de Kjeldahl, ampliamente empleado para la determinación de nitrógeno orgánico en alimentos y bebidas, aun cuando implica un laborioso protocolo de química húmeda y con muy bajo rendimiento para ser aplicado al análisis de múltiples muestras.⁵² Por otro lado, la cuantificación de proteínas individuales, incluyendo la Cas y la β -LG, pueden ser llevadas a cabo mediante métodos separativos, como cromatografía^{51,53,54,55} y electroforesis,⁵⁵ que involucran etapas de preparación de muestra que consumen mucho tiempo de análisis. La aplicación de la espectroscopia infrarroja (IR) en la región media del espectro (MIR) ha sido adoptada para el análisis de calidad y composición de productos lácteos por ser una técnica rápida, económica y simple, que permite el análisis de múltiples muestras en poco tiempo.^{56,57} Además, la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) aprobó una técnica basada en espectroscopia IR para el análisis de leche, lo que condujo al desarrollo de diversos analizadores comerciales de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) para la determinación de proteínas totales y caseína, entre otros parámetros.⁵⁸

La espectroscopia FT-IR es una técnica ampliamente aplicada al análisis estructural y dinámico de polipéptidos y proteínas.⁵⁹ Los diferentes patrones de los enlaces hidrógeno, las interacciones dipolo-dipolo, las orientaciones geométricas en hélices α , láminas y giros β o estructuras de configuración aleatoria inducen diferentes frecuencias en las vibraciones C=O que pueden ser correlacionadas con la respectivas estructuras secundarias.⁶⁰ Las bandas de absorción más prominentes de las proteínas en el espectro IR son causadas por vibraciones del grupo peptídico y son referidas como bandas amidas. Por un lado, la banda de amida I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), originada principalmente por las vibraciones por estiramiento de los grupos carboxilos (C=O), es la más utilizada para el análisis de estructura secundaria.^{61,62} Por otro lado, la banda de amida II ($1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$), originada por las vibraciones por estiramiento de los grupos C-N y flexión de los grupos N-H, permite el análisis de cambios conformacionales de la estructura de proteínas.⁶³

Una de las limitaciones presente en el análisis de proteínas en medio acuoso es la absorción del agua en la región amida I ($\sim 1645\text{ cm}^{-1}$). Por este motivo, la longitud de paso óptico que puede aplicarse está restringida a $<10\text{ }\mu\text{m}$, de manera de minimizar la absorción en dicha región.⁶⁴ Consecuentemente, se requieren altas concentraciones de proteínas ($>10\text{ mg mL}^{-1}$) ya que la intensidad de las bandas IR y la relación señal-ruido (SNR) quedan limitadas por la baja longitud del paso óptico.⁶² Además, la baja sección transversal del flujo genera complicaciones experimentales en la celda de flujo y en el

manejo de la muestra, tales como alta presión en el interior de la celda y alta propensión a su obstrucción.

Recientemente, se comenzaron a comercializar los láseres de cascada cuántica con cavidad externa (EC-QCL: *External Cavity-Quantum Cascade Lasers*) como una nueva fuente de energía lumínica para la región MIR. Los EC-QCL ofrecen una alta densidad de intensidad de emisión en un amplio rango espectral, operando a temperatura ambiente.^{6,7,8} Son láseres unipolares basados en transiciones inter sub-bandas de electrones dentro de bandas de conducción de semi-conductores. La alta energía de emisión de los EC-QCL permite emplear longitudes de paso óptico para mediciones de transmisión mayores a las alcanzadas por los espectrómetros FT-IR convencionales. En trabajos previos, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas lácteas empleando un EC-QCL de primera generación, mediante análisis de la región amida I.^{65,66} Además, se logró la discriminación entre dos tipos de leche, en base a su tratamiento térmico (baja/alta temperatura), a través de la determinación de la concentración de la proteína lactosérica β -LG.⁶⁶

En este capítulo se describe el desarrollo de una nueva metodología IR utilizando un láser EC-QCL de última generación como fuente lumínica para mediciones de transmisión MIR de proteínas en medio acuoso, en la región amida I y amida II. Se estudiaron las características espectrales de proteínas con diferentes estructuras secundarias en concentraciones tan bajas como 1 mg mL⁻¹. Se comparó el nuevo sistema propuesto con el EC-QCL de primera generación⁶ y con dos espectrómetros FT-IR comerciales, evaluándose el tiempo requerido para las mediciones, el ruido instrumental y las SNR de cada uno de ellos.

El sistema ensamblado y optimizado se aplicó a la determinación de proteínas en leche bovina, mediante calibración multivariada de primer orden. Se implementaron herramientas quimiométricas para llevar a cabo la calibración en presencia de efecto matriz, combinando la preparación de las muestras estándares de calibración en presencia de los componentes de la matriz con el modelado de las variaciones espectrales debidas al efecto matriz con el algoritmo PLS. Mediante el análisis de las regiones amida I y II, se cuantificaron las proteínas individuales y el contenido total de proteínas y se llevó a cabo la clasificación de diferentes tipos de leche bovina comercial en base a las concentraciones de las proteínas lactoséricas α -LA y β -LG.

3.1.2. *Materiales y métodos*

3.1.2.1. Estándares, reactivos y muestras

El dihidrógeno fosfato de sodio dihidrato p.a. ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se adquirió en Fluka (Suiza), mientras que el hidrógeno fosfato de sodio dihidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), el ácido clorhídrico 37%, el etanol (EtOH, 96% v/v) y la solución de hidróxido de sodio 50% en agua, se adquirieron en Sigma-Aldrich (Alemania). Los liofilizados de las proteínas β -LG ($\geq 85\%$), albúmina sérica bovina (BSA, $\geq 98.0\%$), lisozima de huevo de gallina (Lys, $> 90\%$), α -LA ($\geq 85\%$) y Cas se adquirieron en Sigma-Aldrich (Alemania). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q de Millipore (EEUU).

Para la etapa de ensamblado y optimización del dispositivo, se prepararon soluciones estándares stock de β -LG, BSA y Lys disolviendo una masa pesada de liofilizado de proteína en solución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración 16.0 mmol L^{-1} a pH 7.0. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución de la solución stock en solución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración 16.0 mmol L^{-1} a pH 7.0.

Para la etapa de cuantificación de proteínas en muestras de leche bovina, se prepararon soluciones estándares stock de β -LG, α -LA y Cas disolviendo una masa pesada de liofilizado de proteína en solución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de concentración 45.0 mmol L^{-1} a pH 6.6 y se mantuvieron refrigeradas a 4°C .

Las muestras reales consistieron en 19 muestras de leche bovina comerciales, correspondientes a 6 tipos de leches diferentes: pasteurizada, ESL filtrada, ESL centrifugada, ESL HTST directa, ESL HTST indirecta y UAT. Las muestras se analizaron como fueron recibidas, es decir, sin pasos de pre-tratamiento involucrados.

3.1.2.2. Instrumentación

Los ensayos de absorción mediante FT-IR se realizaron en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Vertex 80v (Alemania), equipado con un detector MCT (HgCdTe, MCT: *Mercury-Cadmium-Telluride*) operado con nitrógeno líquido, LN_2 , (detectividad: $D^* = 4 \times 10^{10} \text{ cm Hz } 0.5 \text{ W}^{-1}$ a $9.2 \text{ }\mu\text{m}$) y un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 30 (Alemania) equipado con un detector DLaTGS (*Deuterated Lanthanum α -alanine doped triglycine sulfate*; $D^* = 6 \times 10^8 \text{ cm Hz } 0.5 \text{ W}^{-1}$ a $9.2 \text{ }\mu\text{m}$).

Los ensayos de medición mediante espectroscopia láser IR, se realizaron empleando un dispositivo ensamblado en el laboratorio, cuyas características se describen en la sección 3.1.2.5.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo empleando un instrumento de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Waters 600E, equipado con un detector UV/Vis Waters 2489. La separación cromatográfica se realizó con una columna C18 Symmetry 300 (3.5 μm , 2.1 \times 150 mm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) y la detección de la separación cromatográfica a 205 nm. La adquisición y manejo de datos se llevó a cabo con el programa informático Waters Millennium.

3.1.2.3. Muestras de calibración, validación y reales

Las muestras de calibración se prepararon teniendo en cuenta que el modelo de calibración PLS obtenido en esta etapa se aplicaría luego al análisis de muestras reales de composición compleja. Por lo tanto, las muestras de calibración se prepararon incluyendo todos los componentes presentes en la muestra incógnita de manera de modelar correctamente todas las fuentes de variación espectral. En sistemas simples, las matrices de muestras son perfectamente conocidas y pueden prepararse artificialmente mezclando los componentes individuales de la muestra. Sin embargo, en el caso de la leche no resulta factible la preparación artificial de la matriz en el laboratorio, aun cuando la composición de la leche bovina es conocida. Por este motivo, se propuso una estrategia diferente para la preparación de las muestras de calibración. Es importante considerar, además, el efecto de ciertos componentes de la leche sobre el espectro de absorción IR (ver en la Sección 3.1.3.3), que impide que el espectro de absorción de la leche pueda ser introducido directamente en el modelo PLS construido para la cuantificación. Este problema pudo ser resuelto gracias a la estrategia de preparación de las muestras de calibración planteada en este trabajo.

Para la preparación de las muestras de calibración (Tabla 3.1) se emplearon 2 muestras de leche (UAT y ESL HTST) a las que se les determinó la concentración de proteínas mediante métodos de referencia (explicadas en las secciones 3.1.2.7 y 3.1.2.8). Cada muestra de calibración consistió en un volumen de leche UAT o ESL HTST y una alícuota apropiada de solución estándar de proteína. Debido a su composición, las dos muestras seleccionadas permiten abarcar la mayor variabilidad espectral posible, atribuida a compuestos de la matriz. Se prepararon tres juegos de calibración para α -LA (0.10-1.75 mg mL⁻¹), β -LG (0.20-4.40 mg mL⁻¹) y Cas (20.0-31.0 mg mL⁻¹) en 7 niveles de concentración, de los cuales 4 se prepararon con leche UAT y 3 con leche ESL HTST, por triplicado. Además, para modelar el efecto de la variación del contenido de agua en diferentes tipos de muestras sobre el espectro de absorción IR en la región de la banda de amida I, cada replicado se preparó con un contenido diferente de muestra de leche.

Tabla 3.1. Concentraciones de cada proteína individual en las muestras de calibración

Muestra de Calibración ^a	Leche adicionada (%)	Set 1 (mg mL ⁻¹)			Set 2 (mg mL ⁻¹)			Set 3 (mg mL ⁻¹)		
		α -LA	β -LG	CAS	α -LA	β -LG	CAS	α -LA	β -LG	CAS
C1-01	25	0.10	-	-	-	0.2	-	-	-	20.0
C1-02	50	0.10	-	-	-	0.2	-	-	-	20.0
C1-03	75	0.10	-	-	-	0.2	-	-	-	20.0
C1-04	25	0.50	-	-	-	1.2	-	-	-	23.0
C1-05	50	0.50	-	-	-	1.2	-	-	-	23.0
C1-06	75	0.50	-	-	-	1.2	-	-	-	23.0
C1-07	25	1.00	-	-	-	2.4	-	-	-	26.0
C1-08	50	1.00	-	-	-	2.4	-	-	-	26.0
C1-09	75	1.00	-	-	-	2.4	-	-	-	26.0
C1-10	25	1.50	-	-	-	3.8	-	-	-	29.0
C1-11	50	1.50	-	-	-	3.8	-	-	-	29.0
C1-12	75	1.50	-	-	-	3.8	-	-	-	29.0
C2-01	25	0.75	-	-	-	1.8	-	-	-	25.0
C2-02	50	0.75	-	-	-	1.8	-	-	-	25.0
C2-03	75	0.75	-	-	-	1.8	-	-	-	25.0
C2-04	25	1.25	-	-	-	3.0	-	-	-	27.0
C2-05	50	1.25	-	-	-	3.0	-	-	-	27.0
C2-06	75	1.25	-	-	-	3.0	-	-	-	27.0
C2-07	25	1.75	-	-	-	4.4	-	-	-	31.0
C2-08	50	1.75	-	-	-	4.4	-	-	-	31.0
C2-09	75	1.75	-	-	-	4.4	-	-	-	31.0

^a C1: preparada con leche UHT; C2: preparada con leche ESL HTST

El juego de calibración para la determinación del contenido total de proteínas consistió en 18 mezclas de α -LA, β G y Cas, por triplicado, variando el contenido de leche en cada replicado, resultando en un rango de concentración de proteínas totales de entre 29.0 y 36.0 mg mL⁻¹ (Tabla 3.2). Para la cuantificación de las proteínas individuales, se prepararon un total de 21 muestras de calibración para cada juego (Tabla 3.1).

Adicionalmente, se preparó un juego de validación aplicando la misma estrategia empleada para la etapa de calibración (ver sección 3.1.3.4). En este caso, se prepararon 18 mezclas de validación, 9 preparadas con leche UAT y 9 con leche ESL HTST, adicionando una alícuota apropiada de una mezcla ternaria de α -LA, β G y Cas en 3 niveles de concentración, por triplicado. Se agregaron diferentes cantidades de leche en cada replicado, que a su vez eran diferentes a las empleadas en la etapa de calibración. La variación del contenido de leche en las muestras de validación, con respecto a las de calibración, se propuso para evaluar el éxito o no del modelado del efecto matriz producido por los componentes de la leche sobre el espectro de absorción IR en la región de la banda de amida I.

Tabla 3.2. Concentraciones de proteína total en las muestras de calibración

Muestra de calibración ^a	Leche adicionada (%)	Proteína total (mg mL ⁻¹)
C1-01	40	30.0
C1-02	60	31.0
C1-03	80	31.0
C1-04	40	31.0
C1-05	60	32.0
C1-06	80	33.0
C1-07	40	29.0
C1-08	60	31.0
C1-09	80	32.0
C2-01	40	33.0
C2-02	60	34.0
C2-03	80	35.0
C2-04	40	34.0
C2-05	60	35.0
C2-06	80	35.0
C2-07	40	31.0
C2-08	60	33.0
C2-09	80	33.0

^a C1: preparada con leche UAT; C2: preparada con leche ESL HTST

3.1.2.4. Mediciones FT-IR

Los ensayos de absorción mediante FT-IR se realizaron empleando una celda de flujo, que consistió en dos ventanas de fluoruro de calcio (CaF_2) y un separador de politetrafluoroetileno (PTFE) de 8 μm de espesor. Para reducir al mínimo el contenido de vapor de agua atmosférico, el compartimiento de la celda de flujo se purgó con aire seco, antes de cada medición por 10 minutos y durante el registro de los espectros. Los espectros se registraron en modo de adquisición de datos de doble canal, con una resolución espectral de 2 cm^{-1} , a 25°C. Para cada espectro se promediaron un total de 81 (Vertex, operado a velocidad de barrido de 80 kHz) y 21 (Tensor, operado a velocidad de barrido de 20 kHz) mediciones consecutivas, con un tiempo total de adquisición de 53 s en ambos casos.

3.1.2.5. Mediciones EC-QCL

Los ensayos de medición mediante espectroscopia láser infrarroja, se realizaron empleando un dispositivo ensamblado en el laboratorio, cuyo esquema se presenta en la Figura 3.1.

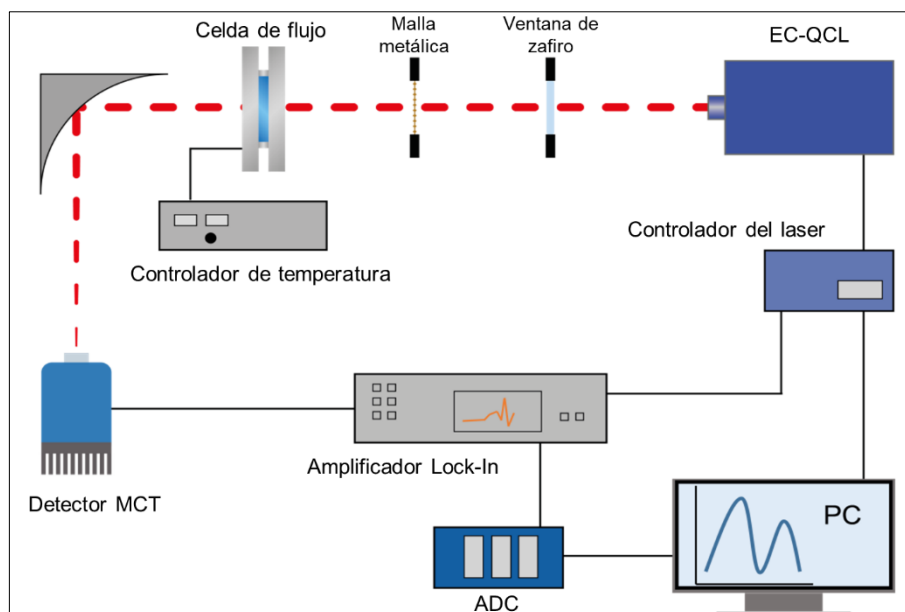


Figura 3.1. Esquema del dispositivo ensamblado para las mediciones mediante espectroscopia láser infrarroja.

El dispositivo consiste en un EC-QCL de última generación (Hedgehog, Daylight Solutions Inc., San Diego, EEUU) mantenido a temperatura ambiente mediante flujo de agua, operado a una velocidad de repetición de 100 kHz y un ancho de pulso de 5000 ns. Los espectros se registraron en un rango de $1730\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$ cubriendo la región de las bandas amida I y amida II de las proteínas, a una velocidad de barrido de $1200\text{ cm}^{-1}\text{s}^{-1}$. Para lograr la atenuación de la intensidad de emisión del láser, se empleó una ventana de zafiro de 2.5 mm de espesor para reducir selectivamente la intensidad en la región amida II, y una malla metálica para reducir aún más la intensidad en todo el rango espectral. Para concentrar el haz de luz IR transmitida por la muestra al detector se empleó un espejo parabólico recubierto de oro. Para la detección se empleó un detector MCT (PCI-10.6, Vigo Systems S.A., Polonia) operado a -78°C por enfriamiento termoeléctrico ($D^* = 8 \times 10^9\text{ cm Hz}^{0.5}\text{ W}^{-1}$ a $6\text{ }\mu\text{m}$). La señal medida se procesó con un amplificador *lock-in* (Stanford Research Systems, EEUU) y se digitalizó con un controlador analógico-digital (ADC) NI DAQ 9239 24-bit (National Instruments Corp., Austin, EEUU).

Para obtener cada uno de los espectros se promediaron 100 mediciones consecutivas, con un tiempo total de adquisición por espectro de 53 s. Los espectros obtenidos consistieron en 6000 sensores. La resolución espectral del EC-QCL se determinó por evaluación del ancho de las bandas de absorción de vapor de agua y la comparación con los espectros registrados mediante FT-IR a diferentes resoluciones, resultando ser de 0.2 cm^{-1} y 2 cm^{-1} para los espectros antes y después del filtrado por transformada de Fourier, respectivamente. La calibración de la escala de número de

onda registrada por el EC-QCL se llevó a cabo con las bandas de absorción de vapor de agua.

Las mediciones se llevaron a cabo empleando una celda de flujo construida en el laboratorio, formada por dos ventanas de CaF_2 y un separador de PTFE de 31 μm de espesor, a 20°C. Para reducir al mínimo el contenido de vapor de agua atmosférico, el compartimiento de la celda de flujo se purgó con aire seco, antes de cada medición por 1 hora y durante el registro de los espectros, cerrando el compartimento del dispositivo ensamblado con una lámina de polietileno.

El manejo del láser se logró empleando un controlador de Daylight Solution, y tanto la adquisición de datos como el control de temperatura se realizaron empleando un programa desarrollado en el laboratorio basado en LabView GUI (National Instruments Corp., Austin, USA).

3.1.2.6. Procesamiento de los datos

Los pasos para el procesamiento de los datos se presentan en la Figura 3.2. En primer lugar, se aplicó un suavizado para reducir el ruido instrumental mediante el método de Savitzky-Golay.⁶⁷ Con el objetivo de eliminar los espectros que presentaban un corrimiento mayor a 0.1 cm^{-1} entre mediciones consecutivas, se obtuvo el índice de similitud mediante el cálculo del producto de coeficientes de correlación entre todas las mediciones individuales. Para un dado espectro x_t , el índice de similitud, que varía entre 0 y 1, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de similitud} = \prod_{i=1}^{100} |r(x_t, x_i)|$$

Ecuación 21

en donde (x_t, x_i) es el coeficiente de correlación entre un espectro dado y los 99 restantes. Este enfoque fue desarrollado y aplicado previamente para calcular la similitud y evaluar el corrimiento de datos cromatográficos.⁶⁸ Empleando este método, se eliminó aproximadamente el 3% de los espectros, los que presentaban un índice de similitud menor a 0.995, antes de promediar las mediciones consecutivas.

A continuación, se aplicó un filtro mediante transformada de Fourier (Fast Fourier Transformation-FFT) a cada espectro promediado de referencia (I_0) y de muestra (I), con

una frecuencia de corte igual a 150-200 Hz. El espectro de absorción final (A) se calculó de la siguiente manera:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Ecuación 22

Para la comparación de los espectros de absorción de proteínas obtenidos con el EC-QCL y los obtenidos mediante espectroscopia FT-IR, se calculó el grado de solapamiento espectral (s_{12}) entre los espectros obtenidos mediante FT-IR (s_1) y EC-QCL (s_2), empleando la siguiente expresión:⁶⁹

$$s_{12} = \frac{\|s_1^T s_2\|}{\|s_1\| \|s_2\|}$$

Ecuación 23

Los valores de s_{12} varían entre 0 y 1, correspondientes a ausencia de solapamiento y solapamiento completo, respectivamente.

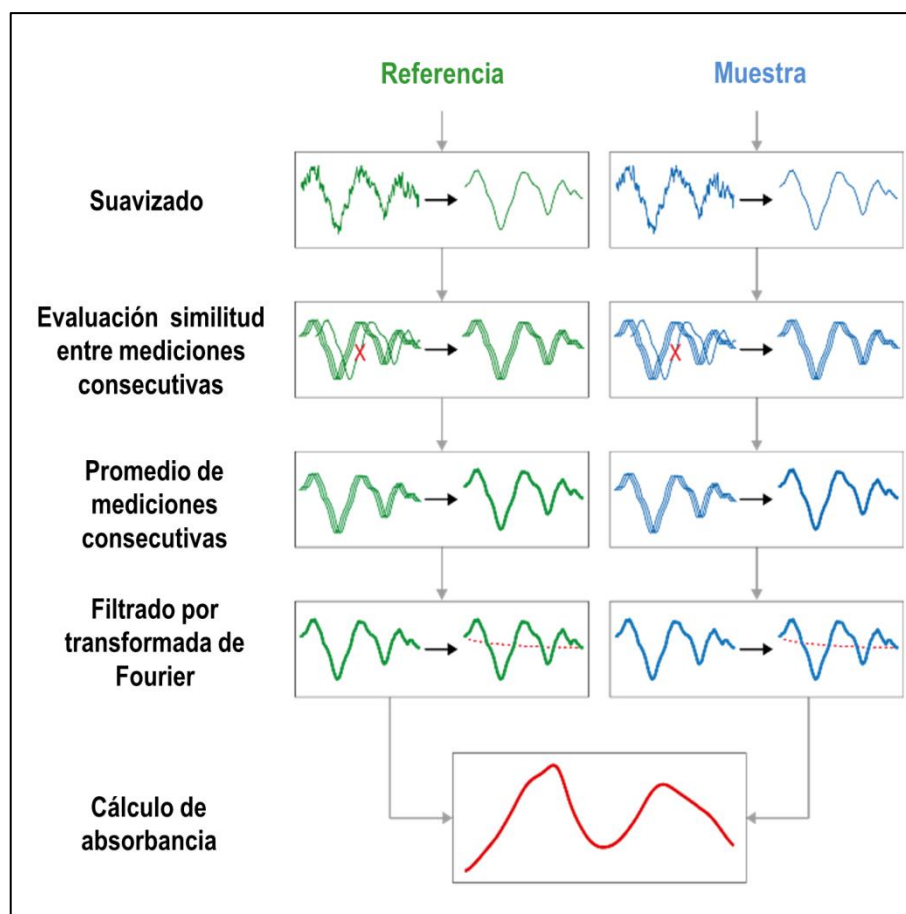


Figura 3.2. Pasos involucrados en el procesamiento de los datos obtenidos por el EC-QCL.

3.1.2.7. Determinación del contenido de nitrógeno por método de Kjeldahl

El contenido de nitrógeno total (TN) se determinó mediante el método de Kjeldahl de acuerdo a IDF/ISO,⁷⁰ la fracción de N no-caseínica (NCN) de acuerdo a IDF/ISO,⁷¹ y la fracción de N no proteica (NPN) de acuerdo IDF/ISO.⁷² El contenido de proteínas lactoséricas se calculó a partir de la diferencia entre NCN y NPN, y el contenido de caseína de la diferencia entre TN y NCN. Los equivalentes de proteína se calcularon a partir de los datos de contenido de nitrógeno usando un factor igual a 6.38.

3.1.2.8. Determinación de α -LA y β -LG por HPLC

La preparación de la muestra para la determinación de α -LA y β -LG, así como el análisis por HPLC, se llevaron a cabo de acuerdo al método estándar IDF/ISO

correspondiente.⁷³ Las proteínas séricas y la Cas se precipitaron a pH 4.6 por adición de gotas de HCl (2 mol L^{-1}). El suero ácido conteniendo la fracción soluble en ácido de las proteínas séricas se separó por centrifugado y se diluyó (1:10 o 1:5 en el caso de la leche UAT) en solución reguladora de fosfato 0.1 mol L^{-1} a pH 6.7. Por último, las soluciones se filtraron con un filtro de $0.20 \mu\text{m}$ Minisart RC 4 (Sartorius, Alemania).

La separación se llevó a cabo en 18 min en modo gradiente seguido de un tiempo de equilibrado de la columna, resultando en intervalos de 35 min entre inyecciones sucesivas. La fase móvil consistió en una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 % en agua ultrapura (Solvente A) y TFA 0.1 % en acetonitrilo (Solvente B). El gradiente de elución se logró incrementando el solvente B linealmente de 36 % a 50 % en 14 min, seguido de un incremento de B a 100 % en 0.5 min, manteniendo a 100 % durante 3.5 min. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C y el flujo de la fase móvil a 0.35 mL min^{-1} . El volumen de inyección de muestra fue de $10 \mu\text{L}$.

3.1.2.9. Programas informáticos

La adquisición y el análisis de los espectros se realizaron con el paquete informático OPUS 7.2 (Bruker, Alemania). En algunos casos fue necesario sustraer la señal correspondiente a las bandas de absorción de vapor de agua atmosférico.

El procesamiento y el análisis de los datos se realizaron empleando una rutina desarrollada en el laboratorio en MATLAB 7.6. El algoritmo PLS se implementó mediante la interfaz gráfica MVC1, disponible en la página web www.iquir-conicet.gov.ar/descargas, desarrollada por Olivieri et al.⁷⁴

3.1.3. Resultados

3.1.3.1. Optimización de la intensidad de emisión del láser

Antes del ensamblado del dispositivo y la incorporación del EC-QCL, se llevó a cabo la caracterización del láser, analizando particularmente la intensidad de emisión. El

máximo de energía ocurre a 1600 cm^{-1} y disminuye en ambas direcciones, como se muestra en la Figura 3.3A.

Cuando el haz de luz atraviesa la celda de flujo conteniendo un medio acuoso, parte de la energía es absorbida por el agua y la señal que alcanza el detector en la región de la banda amida I, coincidente con la región de la banda de absorción del agua, es significativamente menor que la energía en la región de la banda amida II. Esta amplia diferencia entre el mínimo y el máximo de intensidad excede el rango dinámico del detector, afectando de manera negativa los espectros de absorción de las proteínas de interés.

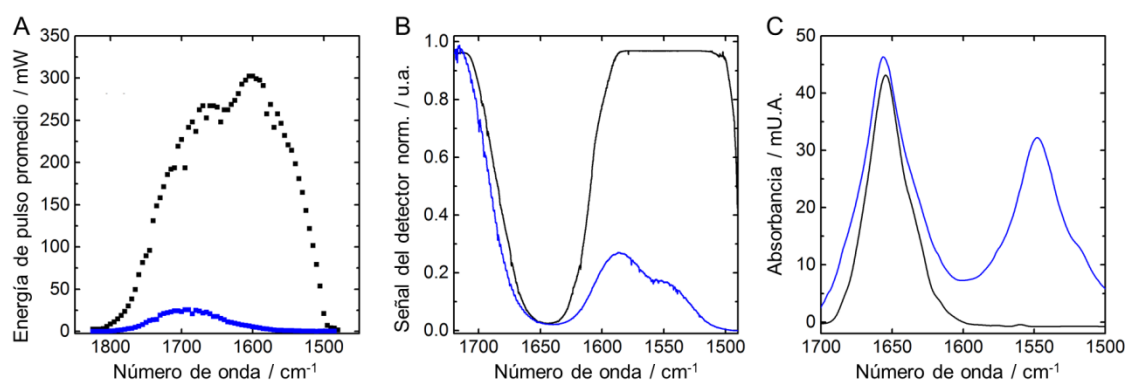


Figura 3.3. Energía de emisión del EC-QCL en el rango espectral de trabajo (A), espectros de transmitancia de una solución acuosa de BSA (B) y espectros de absorción de la proteína BSA (C). En negro se muestra el resultado sin atenuación de la intensidad de emisión del láser y en azul el resultado con atenuación de la intensidad de emisión del láser mediante la ventana de zafiro (2.5 mm) y la malla metálica.

En la Figura 3.3B, se puede observar el espectro de transmitancia registrado por el detector para una solución acuosa de la proteína con la celda de flujo de $31\text{ }\mu\text{m}$ de paso óptico a la máxima corriente del láser (575 mA), resultando en el espectro de absorción que se muestra en la Figura 3.3C (línea negra). Como resultado de la saturación del detector, la banda de absorción amida II no puede revelarse y solo se detecta la banda amida I. La situación no puede resolverse mediante la simple disminución de la corriente del láser, que en principio disminuiría la energía de emisión, ya que esto afecta, además, el rango espectral de emisión del láser, que disminuye a medida que se trabaja a corrientes menores. Por otro lado, debe considerarse la longitud de paso óptico a emplearse al reducir la intensidad del láser. En este caso, se pretendía la atenuación selectiva en la región espectral correspondiente a la banda amida II, de manera de equiparar la situación que ocurre en la región de la banda

amida I, en donde el agua absorbe gran parte de la energía de emisión del láser. Por este motivo, se empleó una ventana de zafiro que actúa como filtro con un valor de corte a 1650 cm^{-1} aproximadamente. Además, se empleó una malla metálica para atenuar la intensidad del láser a lo largo de todo el rango espectral y se disminuyó la corriente del láser a 475 mA. En estas condiciones, se logró registrar un espectro adecuado al rango dinámico del detector, que permitió obtener un espectro de absorción de las proteínas como el que se muestra en la Figura 3.3C (línea azul).

3.1.3.2. Comparación de EC-QCL y FT-IR

Una vez ensamblado el dispositivo y optimizada la intensidad de emisión del láser, se registraron los espectros de absorción de proteínas en diferentes concentraciones, que se muestran en la Figura 3.4 (A-C). El rango espectral del láser permite registrar las bandas amida I y II de las proteínas, haciendo posible un análisis cuantitativo y cualitativo de los espectros de proteínas.

Para la evaluación de desempeño del dispositivo desarrollado, se seleccionaron 3 proteínas modelo que exhiben características espectrales propias de las diferentes estructuras secundarias. La BSA consiste principalmente en estructuras de α -hélices, mostrando la banda característica de α -hélice en la región amida I a $\sim 1656\text{ cm}^{-1}$ y una fina banda en la región amida II a $\sim 1545\text{ cm}^{-1}$. La β -LG se compone principalmente de una estructura secundaria de láminas β y muestra un máximo de banda distintivo a $\sim 1633\text{ cm}^{-1}$ y un hombro a $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ en la región amida I, y una banda de absorción a $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ en la región amida II. Por último, se midió el espectro de absorción de la Lys, una proteína que presenta una estructura secundaria que contiene α -hélices y láminas β , resultando un espectro con un máximo de banda a 1656 cm^{-1} y dos hombros a $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1675\text{ cm}^{-1}$ en la región amida I, y una banda a 1545 cm^{-1} en la región amida II.

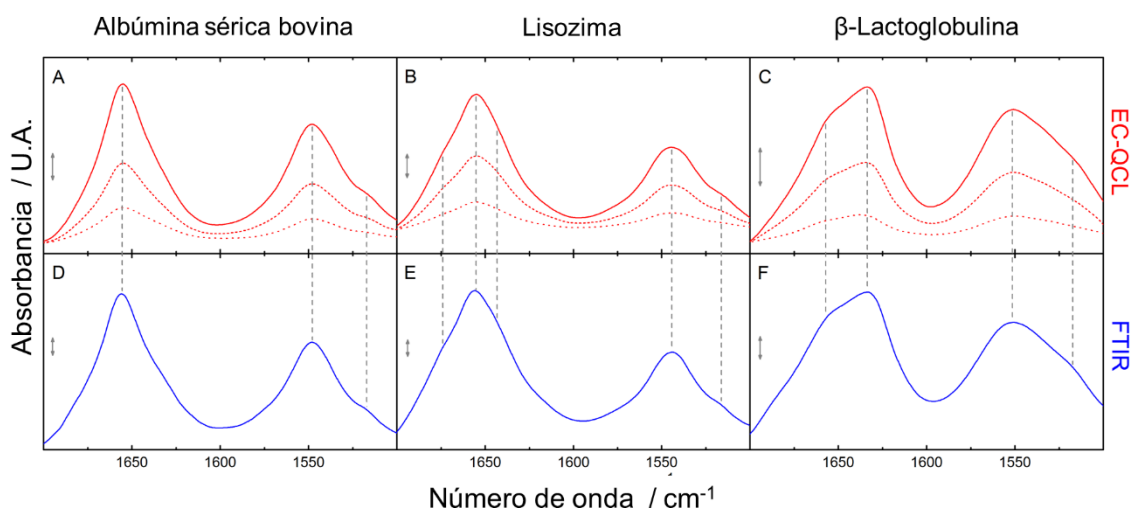


Figura 3.4. Espectros de absorción IR registrados para 3 proteínas con el EC-QCL (A-C) y con un instrumento FT-IR (D-F). Las líneas rojas continua, punteada y discontinua corresponden a concentraciones de 5.0, 2.5 y 1.0 mg mL^{-1} , respectivamente.

El registro de los espectros de las 3 proteínas en 6 niveles de concentración permitió identificar las características propias de cada estructura secundaria hasta una concentración de 1 mg mL^{-1} en solución acuosa. Las áreas de las bandas amida I y amida II se emplearon para construir las curvas de calibrado y obtener los parámetros de regresión lineal. Las curvas obtenidas en un rango de concentración de entre 0.50 y 10.0 mg mL^{-1} se muestran en la Figura 3.5.

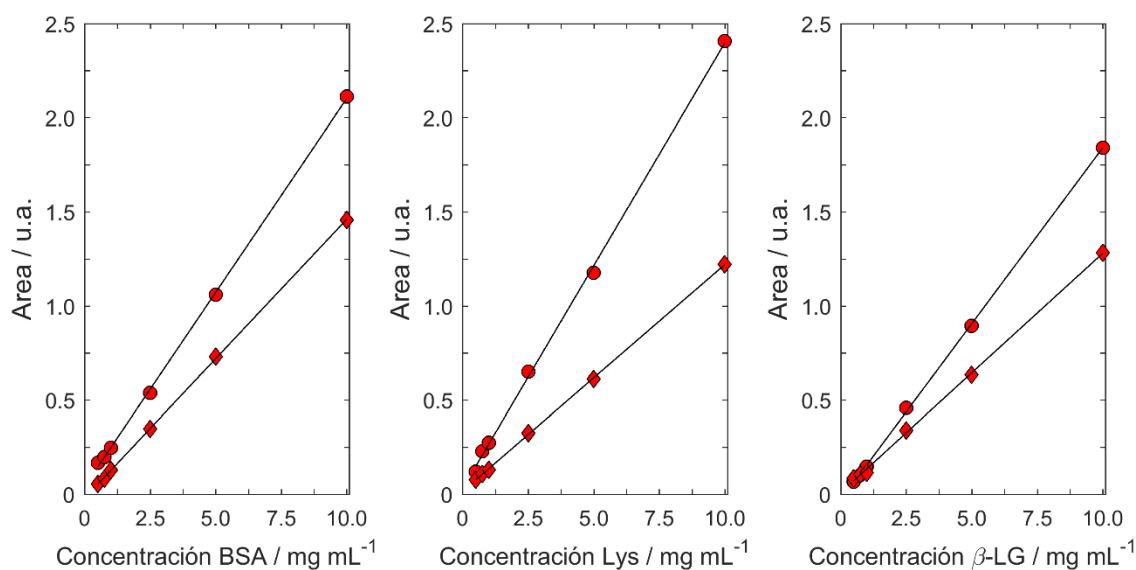


Figura 3.5. Curvas de calibración obtenidas para BSA, Lys y β -LG. Áreas de las bandas amida I (círculos) y amida II (rombos) en función de la concentración de proteínas y líneas de regresión lineal (líneas continuas negras).

Además, se obtuvieron los espectros de las 3 proteínas por FT-IR para realizar la comparación con los espectros obtenidos mediante EC-QCL. Los espectros de absorción obtenidos por FT-IR, con un paso óptico de 8 μm , para soluciones acuosas de 20 mg mL^{-1} de las 3 proteínas se muestran en la Figura 3.4 (D-F). La comparación visual entre los espectros revela la excelente concordancia entre los espectros de las proteínas obtenidos por el sistema propuesto y por FT-IR. Con el objetivo de cuantificar la congruencia entre los dos sistemas se calculó el grado de solapamiento espectral entre los espectros normalizados empleando la Ecuación 23. Los s_{12} obtenidos para BSA, Lys y β -LG fueron de 0.99175, 0.99585 y 0.99444, respectivamente.

Adicionalmente, se evaluó el desempeño del dispositivo presentado con el EC-QCL de primera generación y con dos espectrofotómetros FT-IR comerciales. Los parámetros característicos estudiados se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resultados obtenidos y comparación de dispositivos basados en EC-QCL e instrumentos FT-IR convencionales para mediciones de transmisión IR.

Instrumento	Tiempo [s] / mediciones consecutivas	RMS-Ruido 10^{-5} [AU]	Paso óptico [μm]	SNR ^a
EC-QCL 1 ^{ra} gen.	250 / 100	37	38	515
EC-QCL última gen.	53 / 100	6.2	31	2425
FTIR Vertex	53 / 81	2.7	8	1481
FTIR Tensor	53 / 21	12.1	8	329

^a Evaluada para una solución de proteína de 20 mg mL^{-1}

Para la evaluación del ruido instrumental se calculó el error cuadrado medio (RMS) de las líneas 100 % de agua en la región de 1700-1600 cm^{-1} , mostradas en la Figura 3.6. Las líneas 100 % se obtienen al calcular la absorbancia utilizando dos espectros de transmitancia subsecuentes de una misma solución. En situaciones ideales, el resultado corresponde a una línea de absorbancia 0 en todo el rango espectral. Sin embargo, en condiciones reales las intensidades varían en valores cercanos a 0 debido al ruido. Por lo tanto, el valor de RMS de las líneas 100 % resulta un dato representativo del nivel de ruido.

Al comparar los dos dispositivos de medición con EC-QCL, el láser de última generación presentó un valor de ruido instrumental menor por un factor de ~ 6 , requiriendo de un tiempo de medición 5 veces menor. La mayor velocidad de adquisición para la misma cantidad de mediciones consecutivas y el doble de rango espectral fue posible gracias a la mayor velocidad de barrido que presenta el láser de

última generación. El bajo nivel de ruido se atribuye a la mayor reproducibilidad de número de onda de las mediciones consecutivas, combinado con la rutina de pre-procesamiento desarrollada que permite eliminar mediciones ocasionales que presentan alto grado de corrimiento. Por último, con el dispositivo ensamblado y optimizado se logró obtener una mejor SNR, que difiere en un factor de ~ 5 en comparación al láser de primera generación.

Posteriormente, se llevó a cabo la comparación del RMS obtenido con el nuevo dispositivo y los obtenidos con los dos instrumentos comerciales de FT-IR, uno de alta gama y uno de rutina. El tiempo de adquisición de las líneas 100 % de agua fue igual al requerido por el EC-QCL de última generación. Para las mediciones con FT-IR se empleó un paso óptico de 8 μm .

El nivel de ruido obtenido por el instrumento de FT-IR de alta gama fue ~ 2.3 veces menor al obtenido por el EC-QCL. Esta diferencia debe evaluarse considerando el ruido instrumental despreciable aportado por la fuente de energía lumínica de baja intensidad del FT-IR en comparación con el alto nivel de ruido introducido por la fuente láser, particularmente cuando es operada en modo pulsado.

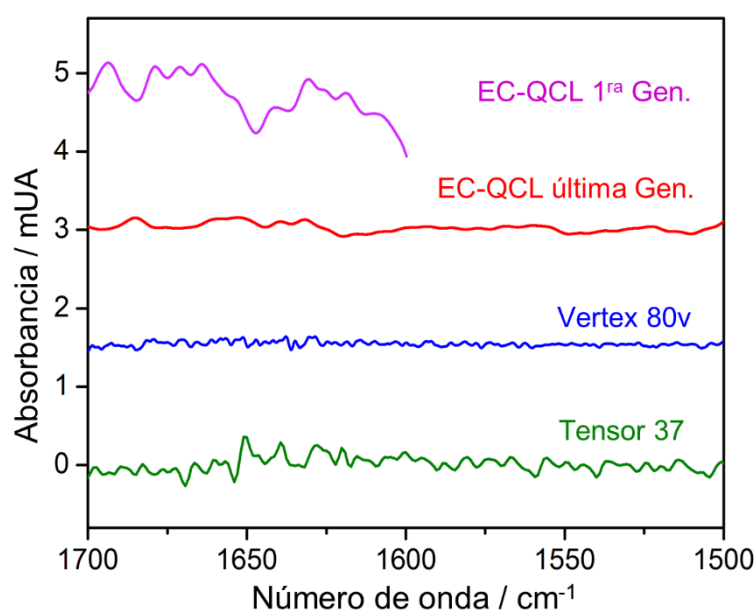


Figura 3.6. Líneas 100 % de agua obtenidas con dos EC-QCL (primera y última generación) y con dos instrumentos FT-IR comerciales (Vertex y Tensor).

Además, la detectividad del detector MCT operado con LN_2 es 5 veces mayor que la del detector MCT con enfriamiento termoeléctrico empleado en el dispositivo del EC-QCL. La SNR obtenida mediante EC-QCL fue 2 veces mayor a la alcanzada con el

instrumento FT-IR de alta gama, debido a la mayor longitud de paso óptico que puede ser aplicada al emplear la fuente láser de alta intensidad. Por otro lado, la SNR fue 7 veces mayor en comparación al FT-IR de rutina. Por último, cabe remarcar la ventaja de la espectroscopia de FT-IR convencional en cuanto al rango espectral cubierto, en comparación con la espectroscopia IR láser.

3.1.3.3. Espectros de absorción de proteínas lácteas

Con el objetivo de aplicar el dispositivo ensamblado a la cuantificación de proteínas en leche bovina, se continuó con la evaluación de los espectros de absorción IR de 3 proteínas presentes en dicha muestra. En la Figura 3.7A se observan los espectros correspondientes a α -LA, β -LG y Cas superpuestos. Si bien se pueden evidenciar diferencias en las características espectrales, el alto grado de solapamiento impide la cuantificación simultánea de las 3 proteínas mediante métodos de calibración univariados. Por tal motivo, la calibración multivariada de primer orden se propuso como la alternativa adecuada para la resolución del sistema en cuestión. Por otro lado, se llevó a cabo el análisis de los espectros de una mezcla ternaria de las proteínas en estudio disueltas en agua y su comparación con el espectro de una muestra de leche. Esta última se analizó mediante inyección de un volumen de leche, sin pre-tratamiento o extracción, en la celda de flujo y el posterior registro de los espectros de transmitancia. El resultado se muestra en la Figura 3.7B, en la que puede evidenciarse con claridad el marcado efecto matriz que sufren las proteínas en presencia de los demás componentes de la leche. En la región de la banda de absorción del agua, superpuesta con la región amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), se produce un efecto atribuido a la presencia de componentes propios de la matriz, como los azúcares y las grasas. Estos compuestos no presentan absorción en la región espectral analizada, pero modifican el contenido relativo de agua con respecto al espectro de referencia. Como resultado, se observan variaciones en la intensidad de absorción en la región de la banda de absorción del agua.

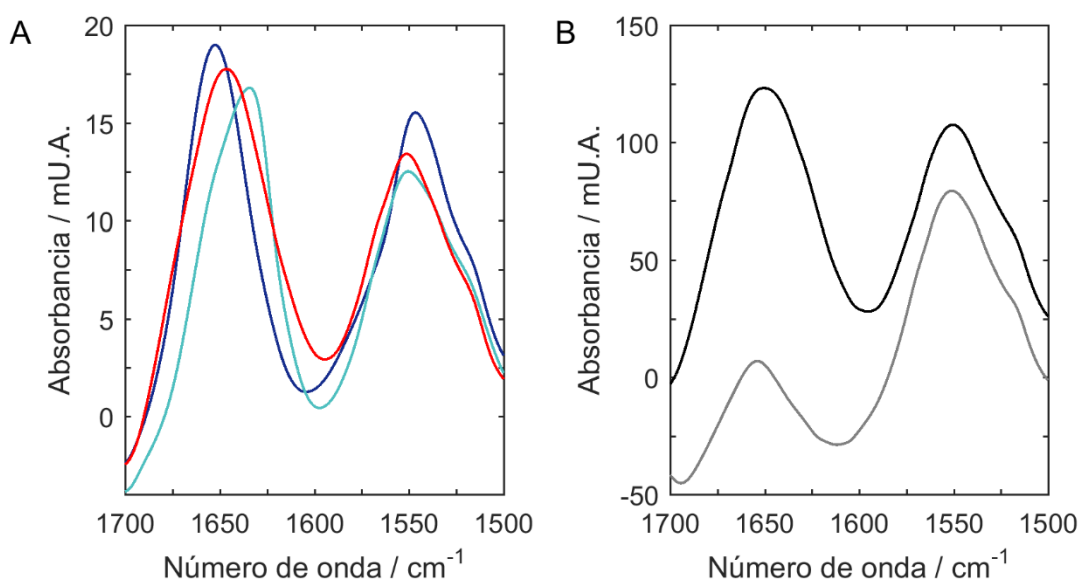


Figura 3.7. (A) Espectros de absorción IR de las proteínas β -LG (línea celeste), α -LA (línea azul) y Cas (línea roja) en solución acuosa y (B) espectros de absorción de una mezcla ternaria de las proteínas (línea negra) y de una muestra de leche bovina (línea gris).

En trabajos previos, este efecto se corrigió por sustracción de la contribución de la matriz a la señal.^{65,66} Para ello, se empleó el espectro de absorción de la α -Lactosa como representativo de la respuesta de los componentes de la matriz y se aplicó SBC (*Science based calibration*) para modelar y predecir la concentración de dichos componentes y restar la señal del espectro obtenido a cada muestra de leche. Este enfoque presenta la principal desventaja de intentar simplificar la respuesta de una matriz compleja con un solo compuesto, lo que podría llevar a resultados erróneos, ya sea por eliminación de información relevante o por introducción de datos ausentes en la respuesta original. Por este motivo, en este trabajo se propuso una nueva estrategia que permite incluir en el modelo de calibración el efecto producido por los componentes de la matriz sobre la respuesta espectral, evitando sustraer información del dato original registrado.

3.1.3.4. Modelado por PLS para la cuantificación de proteínas en leche bovina

Para la cuantificación directa y simultánea de proteínas en leche bovina mediante espectroscopia láser de IR, se aplicó el algoritmo PLS-1 (de aquí en adelante, PLS) de manera de obtener un modelo de calibración para cada proteína de interés. El

modelado por PLS incluye una etapa de calibración, en la que se describe la relación entre la respuesta y la concentración del analito, y una segunda etapa de predicción, en la que se aplica el modelo de calibración obtenido en la primera etapa para estimar la concentración del analito en una muestra de interés. Los parámetros empleados para cada modelo se muestran en la Tabla 3.4. Para obtener modelos robustos y mejorar la capacidad predictiva se aplicaron diferentes pre-procesamientos de la señal, como el centrado de los datos o la segunda derivada, y se seleccionaron regiones espectrales diferentes para cada modelo. La determinación del número de variables latentes se llevó a cabo mediante validación cruzada. Los números óptimos de variables latentes resultaron altos debido a la gran cantidad de compuestos presentes en las muestras, que fueron incluidos en la etapa de calibración, y que aportan variabilidad espectral en el sistema en estudio.

Tabla 3.4. Parámetros del modelado por PLS

Parámetro	α -LA		β -LG		Cas	Proteínas totales
	Cal A	Cal B	Cal A	Cal B		
Región espectral (cm ⁻¹)	1696-1624 / 1576-1504	1672-1504	1648-1600	1638-1614	1720-1495	1566-1518
Pre-proces. ^a	2 ^{da} Der / MC	2 ^{da} Der / MC	MC	MC	MC	MC
VLs ^b	9	7	9	6	9	6
RMSECV ^c	0.14	0.19	0.14	0.09	0.32	0.34
Var. Exp (%) ^d	99.967	99.847	99.989	99.936	99.998	99.940
LOD _{min}	0.077	0.052	0.071	0.11	0.28	0.22
LOD _{máx.}	0.17	0.13	0.21	0.30	0.52	0.35
LOQ _{min}	0.23	0.16	0.22	0.33	0.82	0.67
LOQ _{máx.}	0.52	0.38	0.66	0.93	1.6	1.06

Cal A: curva de calibración completa; Cal B: curva de calibración de nivel bajo.

^a Pre-procesamiento de la señal: Centrado (MC: *Mean Centering*) y 2^{da} derivada (2^{da}Der)

^b VLs: número de variables latentes obtenidas por validación cruzada

^c RMSECV: error cuadrado medio de la validación cruzada

^d Variancia explicada por el modelo

Los modelos se validaron con un juego de muestras de validación para las que se predijeron las concentraciones de α -LA, β -LG y Cas (Tabla 3.5). Para el caso de α -LA y β -LG se emplearon dos rangos de calibración debido a la amplia diferencia entre las concentraciones esperadas en muestras reales de diferentes tipos de leche. Por este motivo, los modelos de calibración de nivel bajo se construyeron restringiendo las concentraciones en los rangos de 0.10-0.75 mg mL⁻¹ y 0.20-1.80 mg mL⁻¹ para α -LA y β -

LG, respectivamente, seleccionando las muestras de calibración correspondientes. El modelo obtenido para nivel bajo se aplicó en los casos en los que los resultados de predicción obtenidos para las muestras de validación o de leche analizadas con la curva de calibración completa estaban dentro del rango de concentración de nivel bajo.

El desarrollo y la aplicación de la estrategia descrita permitieron la predicción de la concentración de las proteínas de interés en los rangos estudiados, aún en presencia de variaciones en la señal atribuidas al efecto matriz. Es importante destacar la ventaja aportada por este método, con respecto a los métodos estandarizados de referencia, ya que permite el procesamiento de la muestra tal como se presenta originalmente, evitando pasos de pre-tratamiento de muestra y de corrección de espectros.

Por otro lado, se estimaron los LODs y LOQs para α -LA, β -LG y Cas. Estas cifras de mérito se obtuvieron y expresaron como intervalos (min-máx.) aplicando el enfoque propuesto por Allegrini et al.,⁴² en el que los límites de PLS se calculan considerando el análisis multivariado y cuyos valores dependen de la variabilidad en la composición de la matriz. Los límites obtenidos, presentados en la Tabla 3.4, resultaron adecuados para la detección y cuantificación de los analitos de interés en las muestras sometidas a tratamientos de baja temperatura en las que las concentraciones de proteínas son mayores. Sin embargo, de acuerdo a las concentraciones presentes de α -LA y β -LG en las muestras tratadas a altas temperaturas, en algunos casos las proteínas se encontraron por debajo del LOD o LOQ.

Los modelos validados se aplicaron a la cuantificación de proteínas en muestras de leche bovina comerciales, evaluándose el desempeño del método y su aplicabilidad al análisis de rutina para este tipo de muestras.

3.1.3.5. Cuantificación de proteínas en leche bovina

Se determinaron las concentraciones de α -LA, β -LG, Cas y proteínas totales en muestras de leche bovina comerciales mediante espectroscopia láser IR, empleando el nuevo dispositivo desarrollado acoplado a calibración multivariada, y se compararon con los resultados obtenidos mediante los métodos de referencia descritos previamente. La evaluación visual de las predicciones de concentración para las muestras analizadas, presentadas en la Tabla 3.6, sugiere que el método es apropiado para la determinación de proteínas totales y la cuantificación de las proteínas individuales de interés. Sin embargo, para poder determinar si el método propuesto podría ser aceptado como potencial método alternativo, se llevó a cabo la comparación estadística de los resultados obtenidos mediante el nuevo método basado en EC-QCL y

los obtenidos mediante métodos de referencia. Para ello, se graficaron las concentraciones de proteínas obtenidas mediante EC-QCL en función de las concentraciones obtenidas mediante el método de referencia correspondiente y se obtuvieron los parámetros de regresión lineal. A continuación, se calcularon las regiones elípticas de confianza conjunta (EJCR) y se verificó la inclusión del punto ideal (Figura 3.8), de pendiente igual a 1 y ordenada al origen igual a 0, dentro de la elipse.⁷⁵ En todos los casos estudiados, es decir, para las concentraciones de α -LA, β -LG, Cas y proteínas totales, el punto ideal se localizó dentro de la elipse indicando que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos.

La evaluación más detallada de los resultados permite notar que las predicciones obtenidas para las proteínas presentes en altas concentraciones, como Cas o α -LA y β -LG en muestras tratadas a bajas temperaturas, se asemejaron más a aquellas obtenidas por los métodos de referencias, que las predicciones obtenidas para las proteínas en bajas concentraciones, como α -LA y β -LG en muestras tratadas con altas temperaturas. Además, es importante mencionar que sólo en dos situaciones los valores de concentración se encontraron por debajo del LOD y no pudieron ser determinadas.

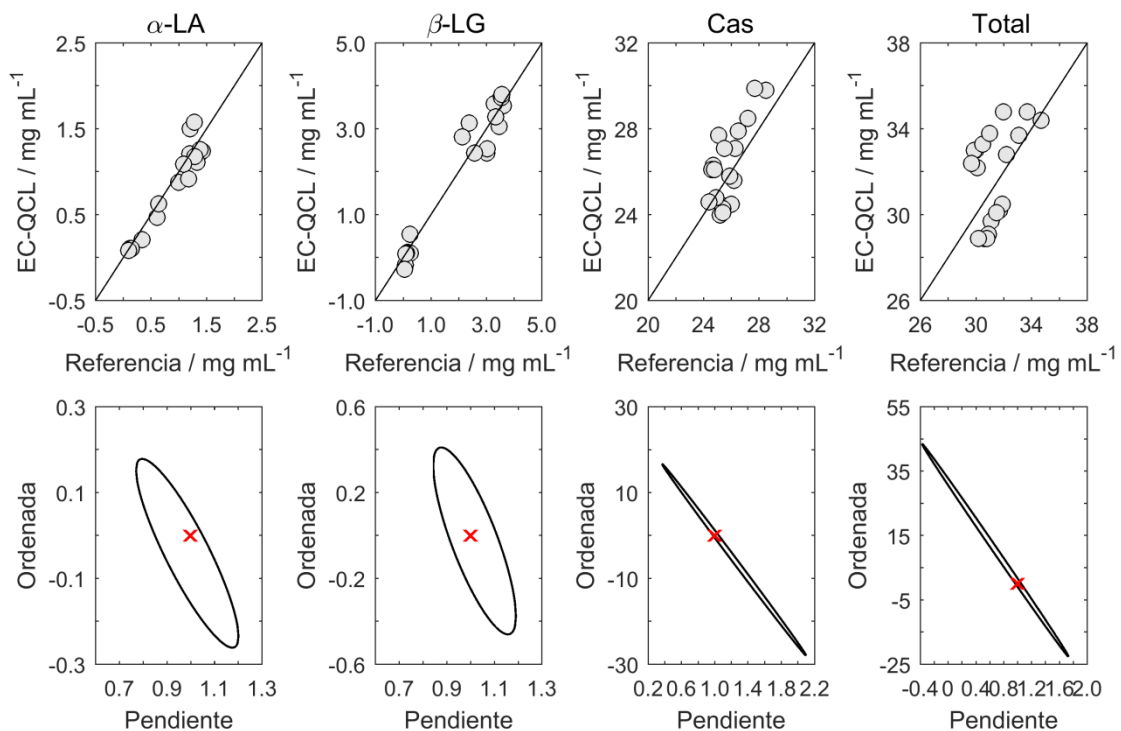


Figura 3.8. Concentraciones obtenidas mediante EC-QCL en función de las obtenidas por el método de referencia para las 3 proteínas individuales y para el contenido proteico total (la línea continua negra indica el comportamiento ideal), y las correspondientes EJCRs (la cruz roja indica el punto ideal de pendiente y ordenada al origen).

Tabla 3.5. Resultados de predicciones por EC-QCL/PLS en muestras de validación

Muestra de Validación	Leche adicionada (%)	α -LA (mg mL ⁻¹)		β -LG (mg mL ⁻¹)		CAS (mg mL ⁻¹)	
		Nominal	Predicho	Nominal	Predicho	Nominal	Predicho
V1-01	40	0.90	0.92	2.0	2.5	24	24.3
V1-02	60	0.90	0.93	2.0	2.2	24	24.3
V1-03	80	0.90	0.94	2.0	2.2	24	23.8
V1-04	40	0.15	0.20 ^a	0.25	0.25 ^a	28	28.0
V1-05	60	0.15	0.24 ^a	0.25	0.33 ^a	28	28.7
V1-06	80	0.15	0.30 ^a	0.25	0.34 ^a	28	28.3
V1-07	40	1.25	1.22	3.4	3.8	22	22.3
V1-08	60	1.25	1.23	3.4	3.9	22	22.6
V1-09	80	1.25	1.24	3.4	3.8	22	22.8
V2-01	40	0.75	1.20	2.7	2.9	28	28.4
V2-02	60	0.75	1.30	2.7	2.8	28	28.7
V2-03	80	0.75	1.39	2.7	2.8	28	28.7
V2-04	40	1.25	1.00	2.0	2.6	30	29.9
V2-05	60	1.25	1.10	2.0	2.7	30	30.1
V2-06	80	1.25	1.19	2.0	1.8	30	30.3
V2-07	40	1.75	1.50	3.5	3.3	26	25.3
V2-08	60	1.75	1.60	3.5	3.8	26	25.8
V2-09	80	1.75	1.69	3.5	3.7	26	26.2
RMSEP (mg mL ⁻¹)			0.25		0.33		0.45
REP (%)			25.6		13.8		1.7

V1: preparada con leche UAT; V2: preparada con leche ESL HTST

^a Calculada con Cal B

Tabla 3.6. Resultados de predicciones por EC-QCL/PLS y por métodos de referencia en muestras de leche bovina

Tipo	Muestra	α -LA (mg mL ⁻¹)		β -LG (mg mL ⁻¹)		Cas (mg mL ⁻¹)		Total (mg mL ⁻¹)	
		Referencia	EC-QCL	Referencia	EC-QCL	Referencia	EC-QCL	Referencia	EC-QCL
Pasteurizada	<i>M-01</i>	1.36	1.20	3.41	3.64	25.6	24.4	31.1	29.7
	<i>M-02</i>	1.43	1.24	3.61	3.54	26.0	24.5	31.7	30.2
	<i>M-03</i>	1.21	1.18	3.28	3.59	25.2	24.0	30.6	28.9
	<i>M-04</i>	1.33	1.11	3.55	3.73	25.4	24.3	30.9	29.1
ESL - Filtrada	<i>M-05</i>	1.20	1.21	3.02	2.44	25.4	24.1	30.8	28.9
	<i>M-06</i>	1.39	1.26	3.46	3.06	26.2	25.6	31.9	30.5
	<i>M-07</i>	1.21	1.50	3.04	2.54	24.9	24.8	30.2	28.9
	<i>M-08</i>	1.28	1.58	3.34	3.28	25.9	25.8	31.5	30.1
ESL – Centrifugada	<i>M-09</i>	1.00	0.88	2.57	2.44	24.7	26.3	30.0	33.0
	<i>M-10</i>	1.29	1.18	3.56	3.80	26.3	27.1	32.0	34.8
ESL – HTST directa	<i>M-11</i>	1.18	0.92	2.38	3.14	25.5	27.1	31.0	33.8
	<i>M-12</i>	1.09	1.09	2.13	2.82	24.4	24.6	29.7	32.4
ESL – HTST indirecta	<i>M-13</i>	0.61	0.47	0.25	0.55 ^a	24.6	26.1	29.9	33.0
	<i>M-14</i>	0.34	0.21 ^a	0.16	0.13 ^a	24.8	26.1	30.1	32.2
	<i>M-15</i>	0.64	0.63	0.26	0.11 ^a	25.1	27.7	30.5	33.3
UAT	<i>M-16</i>	0.12	0.11 ^a	0.12	0.11 ^a	28.5	29.8	34.7	34.4
	<i>M-17</i>	0.15	0.11 ^a	0.08	ND	26.5	27.9	32.2	32.8
	<i>M-18</i>	0.15	0.11 ^a	0.10	0.09 ^a	27.2	28.5	33.1	33.7
	<i>M-19</i>	0.10	0.09 ^a	0.05	ND	27.7	29.9	33.7	34.8
Recuperación promedio			90.0 %		103.5 %		101.7 %		101.6 %

ND: no detectable

^a Calculada con Cal B

3.1.3.6. Discriminación entre tipos de leche en base a las concentraciones de proteínas lactoséricas, α -LA y β -LG.

La determinación de las concentraciones de α -LA y β -LG ofrece la posibilidad de discriminación entre diferentes clases de leche debido a los cambios químicos asociados al tratamiento térmico al que son sometidas en el procesamiento. En trabajos previos, se demostró la posibilidad de clasificación de acuerdo al tratamiento térmico de muestras de leche mediante espectroscopia láser IR a través de la cuantificación de β -LG. Empleando el nuevo dispositivo, con una EC-QCL de última generación, fue posible cuantificar, además, la proteína α -LA, permitiendo una discriminación más detallada entre los diferentes tipos de leche. En la Figura 3.9 se muestran las diferencias entre tipos de leche considerando las concentraciones de α -LA y β -LG.

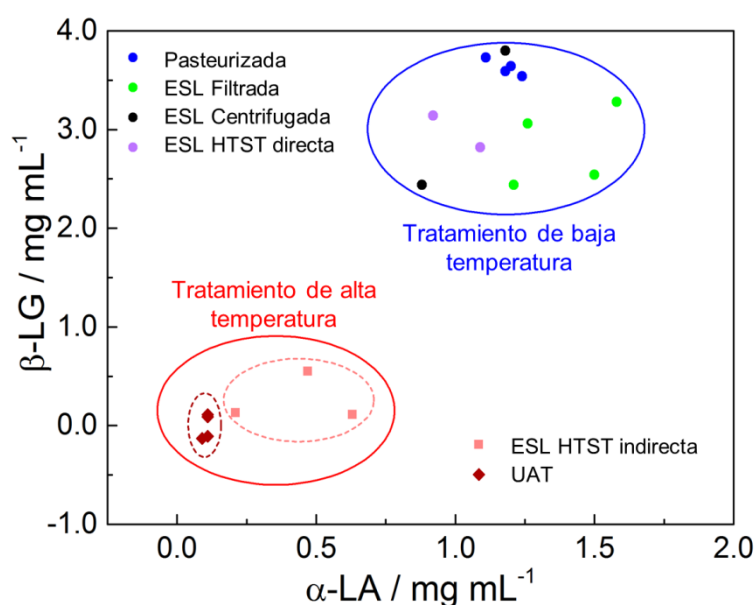


Figura 3.9. Concentraciones predichas de β -LG en función de las concentraciones predichas de α -LA para las 19 muestras de leche bovina comerciales analizadas.

El análisis de la separación entre muestras permite observar 3 discriminaciones. En primer lugar, se observa una clara diferencia entre muestras tratadas con baja y con alta temperatura. Las muestras sometidas a tratamiento con baja temperaturas incluyen las pasteurizadas, las ESL filtradas, las ESL centrifugadas y las ESL HTST directa, y las sometidas a tratamiento con alta temperatura incluyen las ESL HTST indirecta y las UAT. El valor umbral de separación fue de 1.5 mg mL^{-1} de β -LG y 0.75 mg mL^{-1} de α -LA. En segundo lugar, fue posible distinguir entre diferentes técnicas de calentamiento dentro de un mismo tipo de leche. Las ESL HTST pueden ser producidas mediante sistemas de

calentamiento directo o indirecto, influyendo en las alteraciones químicas que experimentan las muestras. El calentamiento directo es un método más suave que lleva a una menor degradación de las proteínas lácteas y, por lo tanto, estas muestras presentan mayor concentración de β -LG y α -LA. Por último, se logró la separación entre muestras ESL HTST indirecta y UAT. Ambos tratamientos son intensos, llevando a una degradación excesiva de la proteína β -LG, altamente sensible a la temperatura. Sin embargo, la evaluación de α -LA permitió discriminar entre muestras de leche ESL HTST indirecta y UAT, con un valor umbral de 0.2 mg mL^{-1} .

El método rápido para la discriminación entre muestras de leche tiene un alto potencial para su aplicación en la industria láctea. Considerando que el método no requiere de largos pasos de preparación de muestra, a diferencia del método empleado actualmente por HPLC, el método mediante espectroscopia láser IR utilizando un EC-QCL de última generación representa una herramienta de gran utilidad para el control de calidad en línea y para aplicaciones en procesos analíticos.

3.1.4. Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un dispositivo para mediciones de transmisión en el infrarrojo medio, basado en EC-QCL de última generación para el análisis de proteínas en las regiones amida I y amida II. Se lograron medir exitosamente proteínas con diferentes estructuras secundarias, en concentraciones de hasta 1 mg mL^{-1} , y evaluar características espectrales propias de cada una. El uso de un EC-QCL de última generación permitió registrar mediciones consecutivas a alta velocidad, con buena reproducibilidad de longitud de onda. El desarrollo de un esquema de procesamiento de datos para el cálculo de los espectros de absorción permitió alcanzar valores de SNR mayores a los obtenidos mediante FT-IR, el método estándar más empleado en espectroscopia IR, a tiempos de mediciones similares. Si bien existe la limitación del rango espectral alcanzado en comparación con FT-IR debido al rango de emisión restringido que presentan los EC-QCLs, se obtiene la importante ventaja de la accesibilidad a la región de la amida I utilizando longitudes de paso óptico convenientes. En comparación con el EC-QCL de primera generación, el rango espectral más amplio que incluye las bandas de absorción IR más relevantes de proteínas, provee mayores ventajas en el análisis cualitativo y cuantitativo.

El dispositivo desarrollado se aplicó exitosamente al desarrollo de un método analítico rápido y simple para la cuantificación de las proteínas Cas, β -LG, α -LA y proteínas totales en muestras de leche bovina. La combinación del sistema optimizado para análisis de proteínas en medio acuoso con herramientas de calibración multivariada permitió la evaluación rápida de muestras de leche bovina comerciales sin la necesidad de aplicar pre-tratamiento de muestra. La comparación de los resultados de concentración obtenidos mediante el método desarrollado y aquellos obtenidos mediante métodos estandarizados de referencia confirmó el buen desempeño de la estrategia planteada.

El método reportado tiene un gran potencial como alternativa a los métodos actuales, que implican una preparación de muestras complicada y extensos tiempos de análisis. Con los límites de detección bajos alcanzados, el método de alto rendimiento presentado permite la cuantificación de proteínas sensibles a la temperatura, α -LA y β -LA, que permiten la discriminación entre diferentes tipos de leche bovina comerciales. La posibilidad de diferenciación entre muestras leche mediante un método rápido es relevante en la aplicación de tecnologías y políticas de procesamiento de alimentos y, por lo tanto, de especial interés en la industria láctea.

3.2. Cuantificación de metil-pirimifos en granos de maíz mediante modelado de arreglos de tres vías: matrices de excitación-emisión de fluorescencia en medio micelar

3.2.1. Consideraciones generales

Los cereales representan uno de los alimentos mayormente producidos y consumidos a escala global debido, principalmente, al importante rol que juegan en la dieta como fuente de energía y nutrientes.⁷⁶ De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*FAO - Food and Agricultural Organization*), Argentina es líder mundial en este sector productivo, especialmente en cultivo de maíz y trigo. En este sentido, este organismo reportó niveles record de producción en el año 2017 en Argentina, siendo el tercer año consecutivo de producción record en este país.⁷⁷ El alto nivel de producción implica un constante esfuerzo por mejorar las condiciones de cultivo para incrementar el rendimiento y las ganancias económicas, incluyendo el uso de agro-químicos que permitan la prevención, reducción o eliminación de plagas. En particular, el cuidado y la protección de los granos almacenados representan una problemática de especial interés, que involucra el uso de diferentes tipos de plaguicidas, como insecticidas y fungicidas. No obstante, su uso podría dejar residuos en el producto final perjudiciales para la salud humana o animal. Es por ello que debe aplicarse un estricto control sobre el producto final para determinar que los agro-químicos empleados, en caso de que se encuentren

presentes, no superan los límites establecidos por los organismos de regulación y asegurar la inocuidad del producto.⁷⁸

Uno de los plaguicidas más usados para la protección de granos almacenados es el metil-pirimifos (PMM),⁷⁹ un insecticida organofosforado (OPPs) clasificado como de peligro moderado de acuerdo al criterio de clasificación de toxicidad sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁸⁰ El mecanismo de acción del PMM, al igual que todos los OPPs, es mediante la inhibición de la enzima acetilcolinaesterasa del sistema nervioso y la consecuente acumulación del neurotransmisor acetilcolina, resultando tóxico tanto para insectos como para otros animales como aves, anfibios y mamíferos.⁸¹ El límite máximo de residuo (LMR) establecido para PMM en granos de maíz almacenados es de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ y de $10 \mu\text{g g}^{-1}$, según la Unión Europea (UE)⁷⁸ y el SENASA,⁸² respectivamente.

La determinación de OPPs se realiza a través de diferentes métodos, según se informa en la bibliografía, siendo la cromatografía de gases (GC) la técnica más empleada para este fin.⁸³ Esta técnica puede ser acoplada a una variedad de detectores que permiten mejorar el desempeño de los métodos de monitoreo. Entre ellos, se pueden mencionar los detectores de fotometría de llama,⁸⁴ de nitrógeno fósforo,⁸⁵ de captura de electrones,⁸⁶ de espectrometría de masas⁸⁷ y de espectrometría de masas en tándem.⁸⁸ Además de GC, la cromatografía de líquidos también ha sido aplicada al análisis de OPPs, empleando diferentes detectores como ultravioleta,⁸⁹ de arreglo de diodos (DAD),⁹⁰ espectrometría de masas y espectrometría de masas en tándem.⁹¹

Por otro lado, las técnicas luminiscentes, como la espectroscopia de fluorescencia, resultan de especial interés ya que son más simples y menos costosas que las técnicas separativas. En principio, pueden ser aplicadas al análisis de compuestos que presentan fluorescencia nativa.¹² Sin embargo, se han desarrollado métodos para inducir o incrementar la emisión de fluorescencia de compuestos con baja fluorescencia intrínseca, por ejemplo, como resultado de una reacción foto-química,⁹² un cambio en el pH del medio¹⁸ o la adición de medios organizados.⁹² Estos últimos generan un incremento en la señal de fluorescencia basado en el uso de ciclodextrinas (CD) o surfactantes, que proveen al analito un microambiente favorable por inclusión de las moléculas en la cavidad interna o en las micelas, respectivamente.¹³

El análisis de muestras complejas trae aparejado el desafío de cuantificar o detectar el analito de interés en presencia de compuestos no calibrados, conocidos o no. Si la presencia de interferencias no modifica la señal intrínseca del analito, pero se observa un espectro o pico cromatográfico solapado, el problema puede resolverse mediante modelado quimiométrico de datos de orden superior.²³ Esta propiedad, conocida como ventaja de segundo orden, ha sido ampliamente empleada para el análisis de muestras

complejas,²² mediante el desarrollo y la implementación de diferentes algoritmos para el procesamiento de datos de segundo orden, tales como U-PLS/RBL,⁹³ MCR-ALS,³⁰ PARAFAC²⁶ y ATLD.³¹

Cuando los componentes de la muestra producen un efecto matriz, afectando los perfiles de la respuesta o la sensibilidad del método, la resolución es más compleja. El método de adición estándar, por ejemplo, permite resolver la presencia de efecto matriz, aunque implica un mayor número de experimentos y pasos en la preparación de las muestras para el análisis. La calibración multivía también puede ser implementada para hacer frente al efecto matriz, modelando las respuestas con algoritmos de segundo orden o de orden superior, como U-PLS/N-PLS⁹⁴ y PARAFAC.^{94,95} Además, las técnicas de estandarización han surgido como una propuesta interesante que permiten transformar una señal obtenida bajo una determinada situación, como ser el analito en solvente, en la señal registrada bajo diferentes condiciones, como ser la del analito inmerso en la matriz. Las diferencias en las respuestas también pueden darse como resultado de diversos fenómenos, como cambio del instrumento empleado para registrar la señal, variaciones del instrumento en el tiempo o cambios en las muestras provenientes de diferentes lotes.⁹⁶ Una cuarta fuente de variación surge del tratamiento de las muestras, como la extracción o limpieza.⁹⁷ Uno de los métodos más empleados para estandarización es la estandarización directa sucesiva (PDS: *Piecewise Direct Standardization*), para el cual se selecciona del juego completo de calibración, medido bajo una situación primaria, un sub-juego de muestras que se procesarán bajo la situación secundaria. Con ellas, se lleva a cabo el modelado de una matriz de transformación **F** que se empleará en un paso posterior para transformar la señal obtenida bajo la situación secundaria.⁹⁷

En el presente trabajo se propone llevar a cabo la determinación de residuos de PMM en granos de maíz mediante espectroscopia de fluorescencia. Para ello, se estudiaron diferentes clases y concentraciones de medios organizados con el fin de exaltar la señal de emisión de fluorescencia del PMM y aumentar la sensibilidad del método. Se desarrolló el procedimiento de extracción y limpieza de la muestra para lograr separar el analito de interés de compuestos co-extraídos que provocan una disminución de su intensidad de emisión de fluorescencia. Se planteó un esquema de procesamiento de datos que implica el modelado con PDS y PARAFAC para sortear el efecto matriz, y se aplicó el método desarrollado al análisis de PMM en granos de maíz.

3.2.2. *Materiales y métodos*

3.2.2.1. Estándares, reactivos y muestras

Todos los estándares empleados corresponden a grado analítico. Los estándares de PMM, polioxietileno (23) dodecanol (Brij-35) y β -ciclodextrina (β -CD) se adquirieron en Sigma Aldrich (Estados Unidos), mientras que los de α -ciclodextrina (α -CD) y γ -ciclodextrina (γ -CD) en Cyclolab (Hungría). El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), el acetonitrilo (ACN) y el metanol (MeOH) se adquirieron en Merck (Alemania), el cloruro de hexadeciltrimetilamonio (HTAC) en Fluka (Suiza) y el Triton X-100 en Biopack (Argentina). El acetato de etilo (AE), el diclorometano (DCM), la acetona (ACE) y el dodecilsulfato de sodio (SDS) se compraron en Cicarelli (Argentina). El éter etílico (EE) se adquirió en Aberkon (Argentina). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación de agua Milli-Q[®] de Millipore (Estados Unidos).

Los cartuchos Sep-Pak Florisil Plus se compraron en Waters (Estados Unidos) y los discos de membrana de C-18 se adquirieron en Agilent Technologies (Estados Unidos).

Las muestras de granos de maíz fueron provistas por la Cooperativa Guillermo Lehmann (Pilar, Santa Fe, Argentina).

3.2.2.2. Instrumentación

Los espectros de absorción se registraron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 (Estados Unidos), usando una cubeta de cuarzo de 1.00 cm de paso óptico. Se registraron los espectros de absorción en el rango comprendido entre 215 y 320 nm, a una velocidad de barrido de 1920 nm min⁻¹. El pH de las soluciones se midió empleando un electrodo de vidrio combinado Boeco BA 17 (Alemania), conectado a un potenciómetro Orion (Estados Unidos) 410 A.

Las EEMs, por su parte, se registraron con un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 55 (Estados Unidos), equipado con una lámpara de descarga de xenón, empleando una cubeta de cuarzo de 1.00 cm de paso óptico. Las aperturas de rendija de excitación y emisión se establecieron en 5 nm y el voltaje del fotomultiplicador en 750 V. Las EEMs se obtuvieron a una velocidad de barrido de 200 nm min⁻¹, variando la longitud de onda de excitación entre 240 y 270 nm, $\Delta\lambda_{\text{ex}}=1$ nm, y registrando los

espectros de emisión en el rango comprendido entre 320 y 450 nm, $\Delta\lambda_{em}=0.5$ nm. Las EEMs resultaron ser de dimensión 31×262.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo empleando un instrumento de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) Agilent 1260 LC (Agilent Technologies, Alemania), equipado con desgasificador, bomba binaria, inyector automático, compartimiento para columna termostatzado, detector de arreglo de diodos (DAD) y detector de fluorescencia de barrido rápido (FLD). La separación se llevó a cabo empleando una columna Poroshell 120 EC-18 (3.0 × 50 mm) con un tamaño de partícula de 2.7 μ m (Agilent Technologies, Estados Unidos). El método cromatográfico se adaptó del propuesto por Catala-Icardo et al.,⁹⁰ y consistió en una fase móvil compuesta por una mezcla de ACN y agua en modo gradiente (60% ACN por 1 min y 60-90% ACN por 1 min). El flujo se mantuvo en 1.0 mL min⁻¹ y la temperatura del compartimiento de la columna en 35°C.

3.2.2.3. Preparación de las soluciones de trabajo

La solución estándar concentrada de PMM se preparó disolviendo 2.5 mg de PMM en 25.0 mL de MeOH. La solución estándar intermedia de PMM 5.0 μ g mL⁻¹ se preparó diariamente por dilución de la solución estándar concentrada de PMM en agua ultrapura. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante dilución de la solución estándar intermedia en agua ultrapura.

Las muestras de granos de maíz se pulverizaron utilizando un molinillo de granos, para obtener un polvo fino y homogéneo necesario para la etapa de extracción. La adición de PMM a las muestras se realizó mediante agregado de 250 μ L de una solución estándar acuosa de trabajo de PMM de concentración adecuada a 2.5 g de muestra pulverizada, y homogeneizando adecuadamente luego de la adición. Para el análisis de la muestra sin adición de PMM, se agregaron 250 μ L de agua ultrapura a 2.5 g de muestra molida.

3.2.2.4. Caracterización de PMM

Antes de desarrollar el procedimiento de extracción, se llevó a cabo el estudio de las propiedades ácido-base del PMM. Para ello, se realizó un titulación espectrofotométrica de una solución de PMM 5.0 mg L⁻¹. El procedimiento consistió en la adición de pequeñas alícuotas de NaOH 1 mol L⁻¹ y 0.1 mol L⁻¹ a 25.0 mL de una

solución de PMM en agitación continua, para obtener incrementos de pH en el rango comprendido entre 2.0 y 10.0. Luego de cada agregado de NaOH, se midió y registró el pH de la solución empleando un electrodo de vidrio conectado a un potenciómetro. Una vez alcanzado el pH en cada punto, se transfirieron 2.0 mL de la solución a la cubeta para registrar el espectro de absorción UV, que fueron, luego, devueltos a la solución original para continuar con la titulación.

Se midieron 53 puntos de pH, obteniéndose al completar la titulación una matriz de datos de dimensiones 53×201, compuesta por 53 espectros de absorción registrados a cada punto de pH. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante descomposición bilineal empleando el algoritmo MCR-ALS.

3.2.2.5. Estudio de las propiedades luminiscentes del PMM en presencia de medios organizados.

Se realizó un estudio del comportamiento de la señal de fluorescencia frente al agregado de medios organizados, con el objetivo de lograr la exaltación de la fluorescencia del PMM como consecuencia de la inclusión del analito en micelas o en la cavidad interna de las ciclodextrinas. Para ello, se trasvasaron 2.0 mL de una solución estándar de PMM 0.5 mg L⁻¹ a una cubeta de cuarzo y se registraron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia. Luego, se adicionaron sucesivamente pequeños volúmenes de CD o surfactante, homogeneizando la solución luego de cada agregado y registrando los espectros de excitación y emisión correspondientes. Para evitar la dilución de la muestra, las soluciones de CD y surfactantes se prepararon en una solución de PMM 0.5 mg L⁻¹. Simultáneamente, se midieron soluciones blanco empleando el mismo procedimiento, pero reemplazando las soluciones de PMM por agua ultrapura. Los rangos de concentración de CD y surfactantes se establecieron teniendo en cuenta la solubilidad y, en el caso de los surfactantes, la concentración micelar crítica (CMC) de cada uno de ellos. Las CD estudiadas fueron las α -, β - y γ - CD, mientras que los surfactantes fueron CTAB, DTAB, HTAC, SDS, Triton X-100 y Brij-35.

3.2.2.6. Desarrollo del procedimiento de extracción.

Se estudió la extracción de PMM de las muestras de maíz para diferentes solventes, los que se seleccionaron teniendo en cuenta las diferentes polaridades. Para la evaluación, se seleccionaron 5 solventes de constantes dieléctricas crecientes: EE

($\epsilon=4.27$), AE ($\epsilon=6.08$), DCM ($\epsilon=8.93$), ACE ($\epsilon=21.01$) y ACN ($\epsilon=36.64$).⁹⁸ En primer lugar, se estudió la recuperación de PMM presente en una solución estándar de concentración 0.5 mg L^{-1} preparada en agua. Para ello, se agregaron 2.0 mL de solvente de extracción a 2.0 mL de la solución de PMM, agitando durante 5 min y centrifugando luego por 10 min. En el caso de las extracciones con ACE y ACN, se adicionó MgSO_4 como agente de *salting-out* para lograr la separación de fases. Se transfirió la fase orgánica a una cubeta para registrar los espectros de excitación y emisión. Se realizaron 4 extracciones sucesivas para cada solvente, y se calculó la concentración de PMM en cada uno de los 4 extractos empleando una curva de calibrado construida para cada solvente estudiado.

Una vez seleccionado el solvente de extracción, se evaluó la recuperación de PMM de una muestra de maíz. Los extractos se analizaron en primer lugar por UHPLC-FLD y luego por espectroscopia de fluorescencia en cubeta. Este análisis permitió evidenciar la necesidad de adicionar una etapa de limpieza del extracto para eliminar compuestos co-extraídos que interfieren en el análisis. Se estudiaron diferentes procedimientos con el fin de obtener un extracto final adecuado para el análisis mediante fluorescencia, es decir, libre de compuestos que precipiten frente al agregado de surfactante o que apaguen la fluorescencia del analito de interés. Para lograrlo, se estudiaron la extracción en fase sólida, tanto con cartuchos de fase directa como con membranas de fase reversa, y la extracción líquido-líquido en medio ácido, considerando las propiedades ácido-base del PMM. Se evaluaron los extractos finales teniendo en cuenta la presencia del PMM, la señal de fluorescencia y la turbidez de la solución frente al agregado de surfactante.

3.2.2.7. Estandarización de la señal de fluorescencia y calibración.

Las muestras de calibración consistieron en 5 niveles de concentración de PMM por triplicado, preparadas por dilución de una solución estándar intermedia de PMM en Brij-35 13 mmol L^{-1} . Las concentraciones finales de las muestras de calibración fueron 0.05, 0.15, 0.25, 0.35 and $0.45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Para la estandarización se seleccionaron 3 niveles de concentración, correspondientes a los extremos y al punto central de la calibración. Las muestras de estandarización se prepararon adicionando una solución estándar de PMM a las muestras de maíz, en concentraciones de 0.10, 0.50 and $0.90 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, obteniéndose concentraciones finales luego de la extracción de 0.05, 0.25 and $0.45 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

3.2.2.8. Programas informáticos

Para el control del espectrofotómetro de fluorescencia y UHPLC se emplearon los paquetes informáticos FL WinLab y OpenLab CDS Chemstation, respectivamente.

Todos los algoritmos usados se implementaron en MATLAB 7.6. Para el modelado por PARAFAC se utilizó la interfaz gráfica MVC2, disponible en la página web www.iquir-conicet.gov.ar/descargas, desarrollada por Olivieri et al.⁹⁹

La implementación de PDS se llevó a cabo empleando una rutina escrita por Olivieri, A.C., ejecutada en el entorno de Matlab.

3.2.2.9. Procesamiento por PDS

El algoritmo PDS permite relacionar la respuesta \mathbf{r} de una muestra de estandarización dada bajo una situación A (\mathbf{X}_A) con la respuesta obtenida bajo la situación B (\mathbf{X}_B). La relación entre ambas respuestas se obtiene mediante la matriz de transformación \mathbf{F} , de acuerdo a la siguiente ecuación:⁹⁶

$$\mathbf{X}_A = \mathbf{X}_B \mathbf{F}$$

Ecuación 24

En este trabajo la situación B corresponde a la señal de fluorescencia de PMM, contenida en la matriz \mathbf{X}_B , obtenida para las soluciones estándares preparadas en agua, y la situación A, a la señal de fluorescencia de PMM en las mismas concentraciones que las soluciones estándares en agua, contenida en la matriz \mathbf{X}_A , obtenida en presencia de los compuestos de la matriz. El método PDS se aplica para encontrar la relación entre cada sensor a la longitud de onda j en la situación B con varios sensores a longitudes de onda cercanas en la situación A. Estos sensores del espectro se encuentran en una ventana centrada en la longitud de onda j , y se relacionan a través de la siguiente ecuación:⁹⁶

$$r_j = R_j b_j$$

Ecuación 25

en donde R_j es la matriz de respuesta localizada de la muestra de estandarización y b_j es el vector de coeficientes de transformación para la longitud de onda j . Los vectores de regresión para cada ventana se ensamblan para formar una matriz diagonal F de acuerdo a la Ecuación 26:⁹⁶

$$F = \text{diag} (b_1^T, b_2^T, \dots, b_j^T, \dots, b_k^T)$$

Ecuación 26

en donde k es el número de longitudes de onda y el superíndice T indica la transpuesta de la matriz. Finalmente, cualquier respuesta obtenida bajo la situación A puede ser estandarizada con la Ecuación 24 para obtener la respuesta como si se midiera bajo la situación B. En este trabajo, la señal de excitación-emisión obtenida para un estándar puro de PMM, no afectada por la matriz de la muestra, se transforma en la señal obtenida para el analito en presencia de efecto matriz. Así, se obtiene una nueva curva de calibración teniendo en cuenta el efecto matriz usando sólo tres estándares preparados en la matriz de muestra y minimizando el uso de solventes y el tiempo de análisis.

3.2.3. Resultados

3.2.3.1. Determinación del pK_a

Se obtuvieron las constantes de acidez de PMM mediante titulación espectrofotométrica y posterior modelado de la matriz de datos por MCR-ALS.³⁰ La descomposición se llevó a cabo para 3 componentes, empleando estimaciones iniciales obtenidas por SIMPLISMA.³⁹ Además, se aplicaron las restricciones de no negatividad

tanto en el modo de concentración como en el espectral, y la restricción de sistema cerrado en el modo de concentración. En la Figura 3.10 se muestran los espectros UV obtenidos en cada punto de pH de la titulación y los perfiles espectrales y de concentración resultantes del modelado por MCR-ALS, en los que se pueden distinguir 3 especies en el rango de pH estudiado. Los valores de pka obtenidos fueron de $pK_{a1}=3.4$ y $pK_{a2}=4.4$.

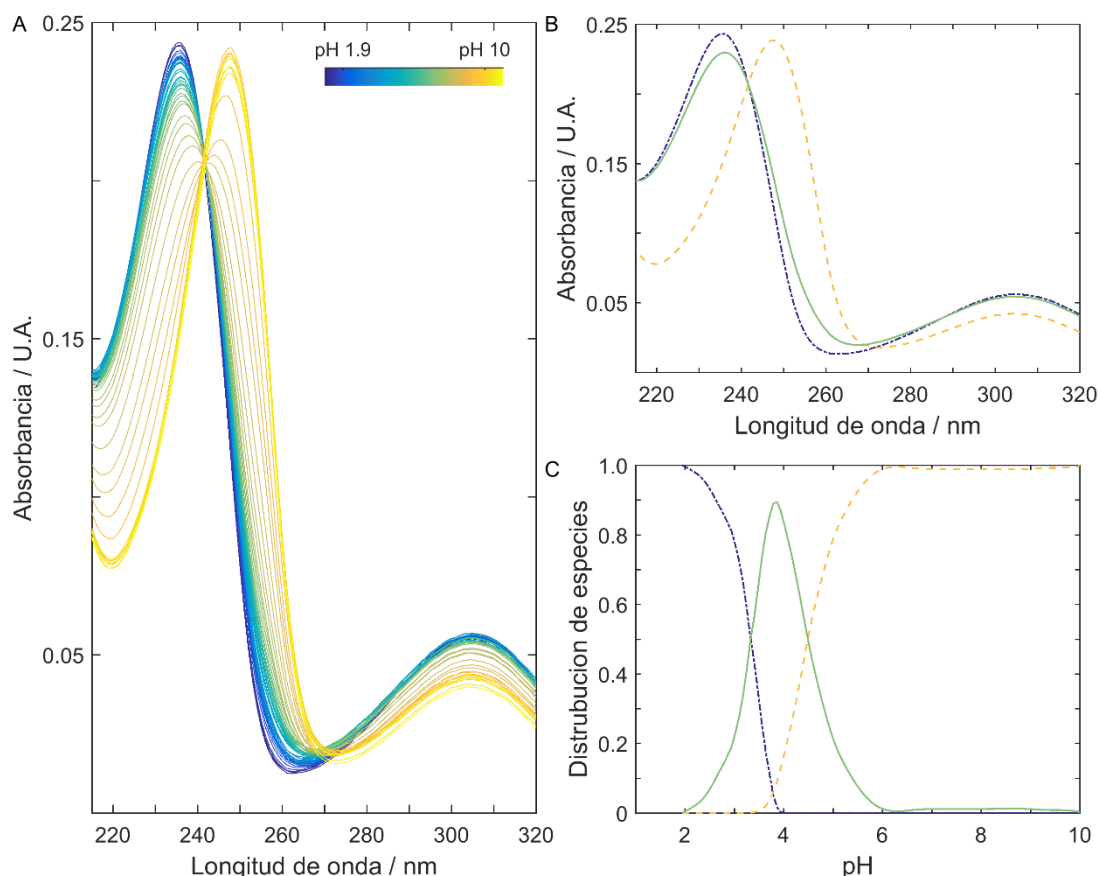


Figura 3.10. Espectros de absorbancia de PMM obtenidos a diferentes pH en la titulación (A). Perfiles de absorción (B) y de distribución de especies (C) obtenidos por MCR-ALS.

3.2.3.2. Efecto de la concentración de surfactantes y ciclodextrinas

Se realizó el análisis de los resultados obtenidos para la exaltación de la emisión de fluorescencia de PMM en presencia de CD y surfactante. En la Figura 3.11 se observa la intensidad de fluorescencia de PMM en función de la concentración de CD o

surfactante, en la que se pueden distinguir tres tipos de comportamientos diferentes en los rangos de concentraciones estudiados.

En uno de ellos, el agregado de CD o surfactante no produce aumento de la señal o bien la disminuye. Tal es el caso de α -CD, DTAB y SDS. En un segundo caso, la intensidad de fluorescencia presenta un aumento hasta alcanzar un máximo, comenzando a disminuir a concentraciones mayores. Los surfactantes CTAB y Tritón muestran este perfil. Finalmente, se observó una tercera tendencia para γ -CD, HTAC y Brij-35 en la que la intensidad de fluorescencia aumenta hasta un máximo y se mantiene constante (plateau). Se considera que este comportamiento es el óptimo, ya que se conoce la concentración en la que se presenta el máximo, asegurándose la obtención de una señal constante al trabajar a concentraciones que la superen. Un caso particular se dio para la β -CD, en el que se observó un aumento de la señal, pero no pudo determinarse el perfil completo debido a la baja solubilidad de la β -CD en agua (10 mmol L^{-1}).

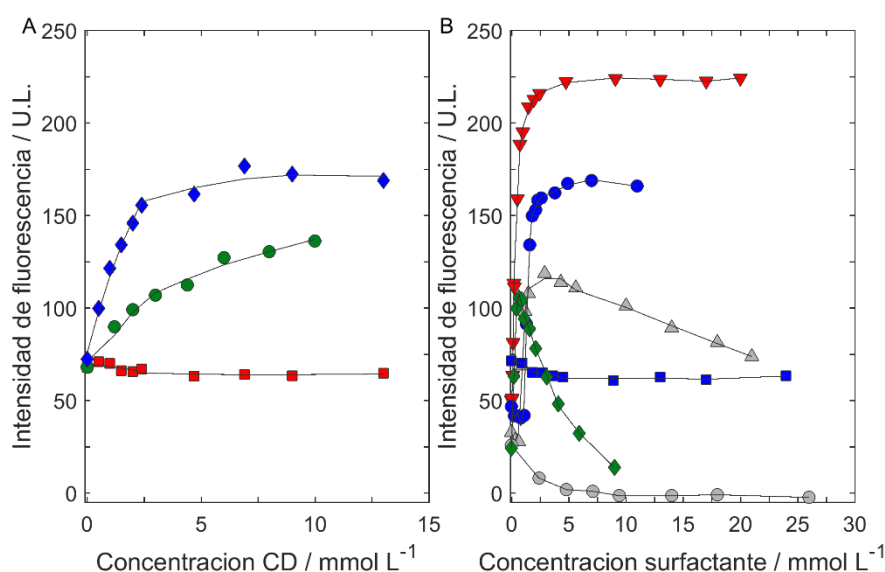


Figura 3.11. Influencia de la concentración de CD (A) y surfactante (B) sobre la intensidad de fluorescencia de PMM.

A. Diamante azul: γ -CD; círculo verde: β -CD; cuadrado rojo: α -CD.

B. Triángulo rojo: Brij-35; círculo azul: HTAC; triángulo gris: CTAB; diamante verde: Tritón; cuadrado azul: DTAB; círculo gris: SDS.

Considerando lo antes expuesto, se seleccionó el surfactante Brij-35 para el desarrollo del método, que presenta el perfil de plateau y produce el máximo aumento de la señal dentro de los medios organizados estudiados con este comportamiento. La

concentración de Brij-35 seleccionada, 13 mmol L^{-1} , fue aquella que se encuentra en el punto medio del plateau, de manera de asegurar la estabilidad en la señal aun cuando la concentración de surfactante este afectada por pequeñas variaciones. La señal de fluorescencia correspondiente a los máximos de excitación y emisión resultó ser ~5 veces mayor en presencia de surfactante (Figura 3.12), permitiendo mejorar la sensibilidad como así también los límites de detección y cuantificación del método en desarrollo.

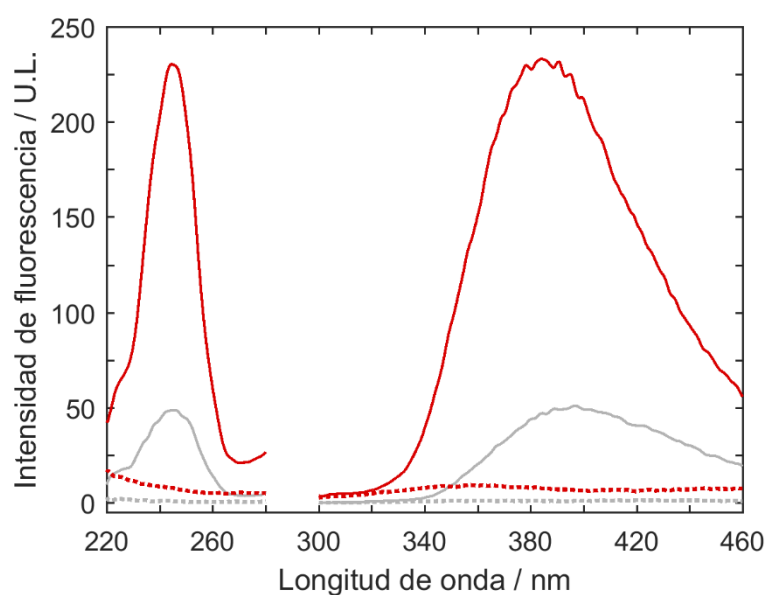


Figura 3.12. Espectro de excitación y emisión de agua (línea de puntos gris), PMM en agua (línea continua gris), Brij-35 (línea de puntos roja) y PMF con Brij-35 (línea continua roja).

3.2.3.3. Procedimiento de extracción

Las concentraciones de PMM halladas en los extractos para los 5 solventes estudiados se presentan en la Tabla 3.7. Se obtuvieron buenos resultados de recuperación para los 5 solventes estudiados. Considerando solo el primer extracto, 4 solventes permitieron lograr recuperaciones mayores al 90 %, siendo el AE y el DM los que mostraron los porcentajes mayores. Teniendo en cuenta la toxicidad del DM, y con el objetivo de reducir la cantidad total de solventes tóxicos empleado en el análisis, se seleccionó el AE para la etapa de extracción del PMM.

Tabla 3.7. Recuperación de PMM en extractos de los cinco solventes estudiados

Solvente	Concentración PMM (mg L ⁻¹)				
	Extracto 1	Extracto 2	Extracto 3	Extracto 4	Total
EE	0.481 (96)	0.179 (36)	0.151 (30)	0.039 (8)	0.850 (170)
AE	0.747 (149)	0.063 (13)	0.034 (7)	0.015 (3)	0.859 (172)
DM	0.568 (114)	ND	ND	ND	ND
AC	0.182 (91)	0.026 (13)	0.013 (7)	0.012 (6)	0.233 (117)
ACN	0.276 (55)	0.149 (30)	0.065 (13)	0.050 (10)	0.540 (108)

ND: no detectable

Recuperación (%) entre paréntesis

Una vez seleccionado el solvente para la extracción de PMM, se estudiaron los resultados en una muestra de maíz, que se fortificó con PMM y se sometió a la extracción con AE. En primer lugar, se analizaron los extractos por UHPLC-FLD de manera de determinar la presencia de PMM, comparando con una solución estándar preparada en AE. La concentración encontrada corresponde a una recuperación de 114 %, lo que permite confirmar la alta recuperación del PMM de muestras de granos de maíz en un solo paso de extracción. Sin embargo, cuando se registraron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia del extracto en cubeta no se detectó señal de PMM (Figura 3.13).

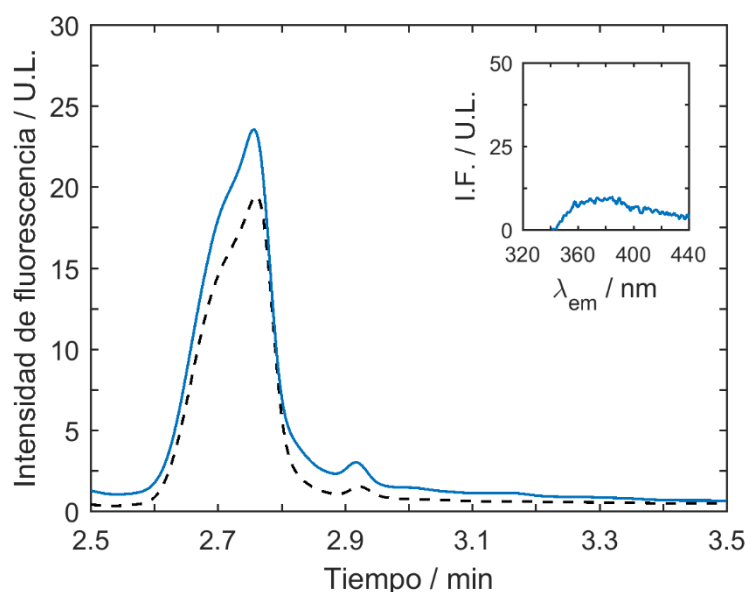


Figura 3.13. Cromatograma obtenidos del extracto orgánico de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y de la muestra (línea continua azul). En el recuadro se muestra el espectro de emisión de fluorescencia obtenido en cubeta para el extracto de la muestra adicionada.

Este resultado sugiere la presencia de compuestos co-extraídos que podrían interferir con la señal del analito, provocando una disminución o apagando por completo la emisión de fluorescencia.

Con el fin de profundizar en el estudio del efecto producido por la matriz, se evaluaron los espectros de excitación y emisión de un extracto de matriz blanco, es decir de una muestra de maíz sin adición de PMM. En primer lugar, se observó un alto grado de solapamiento entre el espectro de excitación de la matriz con el de emisión del PMM, lo que dio lugar a la hipótesis de absorción de la emisión del PMM por parte de uno de los compuestos co-extraídos. Para confirmar el motivo de la ausencia de señal en los extractos se midió el espectro de emisión ($\lambda_{ex}=250$ nm) de una solución del PMM 0.5 mg L^{-1} en AE, y se agregaron pequeñas alícuotas del extracto de AE de una muestra adicionada en la misma concentración, en la que la presencia de PMM fue confirmada por UHPLC, de manera de evitar la disminución de la señal por dilución. El resultado se muestra en la Figura 3.14, en la que se observa la disminución de la señal a medida que se agregan las alícuotas del extracto. Se muestra, además, el espectro de excitación del extracto agregado superpuesto con el espectro de emisión del PMM. De esta manera, se pudo comprobar la presencia de determinados componentes de la matriz que provocan un efecto de filtro interno que impide detectar la señal de emisión del analito de interés.

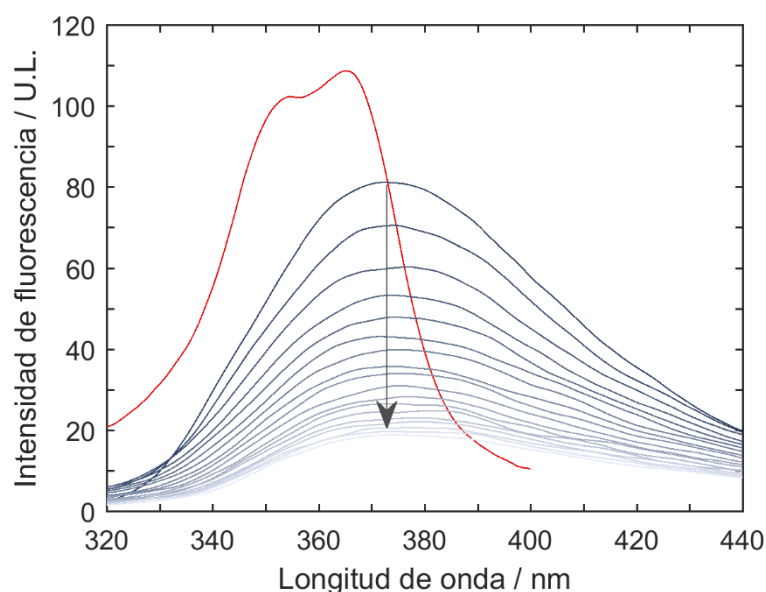


Figura 3.14. Espectro de excitación del extracto de muestra (línea roja) y espectros de emisión de PMM con diferentes concentraciones de matriz de muestra (líneas en escala de azules). La flecha indica el sentido creciente de concentración de los componentes de la matriz.

De manera de lograr la detección de la señal de fluorescencia del PMM, se continuó con el desarrollo del procedimiento de extracción evaluando un paso adicional de limpieza del extracto. En primer lugar, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido teniendo en cuenta los pKas calculados. En este sentido, se preparó una solución de HCl diluido a pH 2.0, con el objetivo de lograr la separación de la especie protonada, soluble en la fase acuosa, de los componentes de la matriz, solubles en la fase orgánica. Sin embargo, al registrar el espectro de emisión de la porción acuosa, posterior a la neutralización de la solución, no se logró detectar señal correspondiente al PMM como así tampoco la señal de los compuestos de la matriz (Figura 3.15). De esta manera, se concluyó que la solución ácida preparada para la limpieza del extracto orgánico no logra separar el PMM del resto de los compuestos co-extraídos con el AE. Posteriormente, se adicionó al extracto acuoso un volumen de surfactante con el fin de exaltar la fluorescencia del PMM, en el caso de que se haya logrado extraer con baja recuperación. No obstante, el agregado de Brij-35 provocó la aparición de un precipitado, resultando en una solución turbia inadecuada para el análisis por fluorescencia. Frente a los resultados obtenidos y descritos, se descartó la opción de limpieza del extracto empleando una solución ácida para una segunda extracción líquido-líquido. Por tal motivo, se continuó con el estudio de los otros dos métodos planteados.

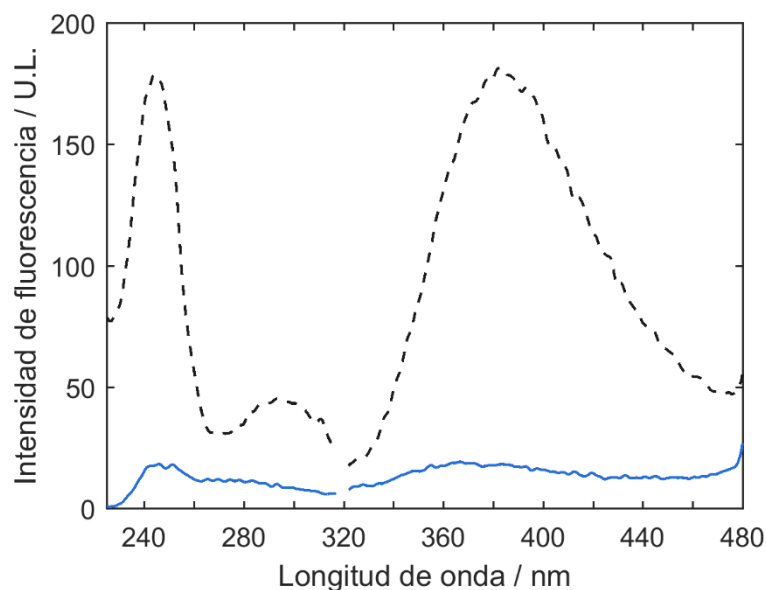


Figura 3.15. Espectros de excitación y emisión de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y del extracto obtenido de la extracción líquido-líquido en medio ácido (línea continua azul).

En el siguiente paso, se evaluó realizar la limpieza del extracto mediante separación en fase sólida, empleando un cartucho de fase normal. En este caso, se buscó la retención de determinados compuestos propios de la matriz de la muestra en la fase sólida estacionaria, recolectando el analito de interés no retenido. El resultado del análisis mediante espectroscopia de fluorescencia permitió evidenciar la señal de PMM en el extracto limpio, indicando la exitosa separación del analito de aquellos compuestos responsables de filtrar su emisión de fluorescencia (Figura 3.16). Sin embargo, el método en desarrollo requiere para el análisis de una solución final acuosa en presencia de surfactante. Luego de evaporar el solvente de extracción y disolver el residuo en una solución de Brij-35 13 mmol L^{-1} se observó nuevamente la aparición de un precipitado. Si bien la separación de los compuestos que apagan la emisión de fluorescencia de PMM fue exitosa, el método de limpieza propuesto no pudo ser aplicado para el análisis ya que no provee una solución final límpida, adecuada para el análisis.

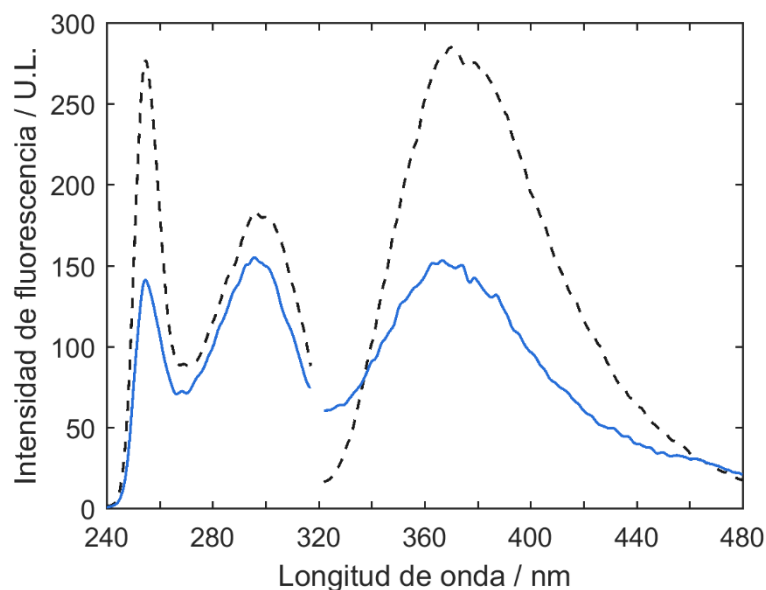


Figura 3.16. Espectros de excitación y emisión de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y del extracto obtenido de la extracción con un cartucho Florisil (línea continua azul).

Finalmente, el tercer procedimiento estudiado consistió en el uso de una membrana C-18, en la que el analito PMM queda retenido y los componentes de los que se busca separarlo la atraviesan y eluyen junto con el solvente. Antes de la elución del PMM de la membrana con ACN, se realizaron tres lavados sucesivos con agua, metanol 5 % y acetona 5 % que permitieron eluir los componentes que interaccionan débilmente con la fase estacionaria y lograr así un extracto final más limpio. El análisis de las fracciones por UHPLC-FLD permitió concluir, que el PMM no eluye en las etapas de lavado y que 2 mL de ACN son suficientes para su elución. Una vez corroborada la presencia de PMM en el extracto, se llevó a cabo el análisis mediante espectroscopia de fluorescencia para determinar si se había logrado la separación de los componentes que apagan la señal de fluorescencia. Para ello, se registraron los espectros de excitación y emisión en cubeta de la fracción final eluida con ACN, evidenciándose la señal de PMM. Posteriormente, se evaporó el solvente para el análisis del extracto por fluorescencia en medio micelar, obteniéndose una solución límpida al disolver el residuo seco en Brij-35 13 mmol L^{-1} , con ausencia de precipitado. En la Figura 3.17 se muestran las señales obtenidas por UHPLC-FLD y los espectros de emisión de fluorescencia del extracto antes y después del procedimiento de limpieza.

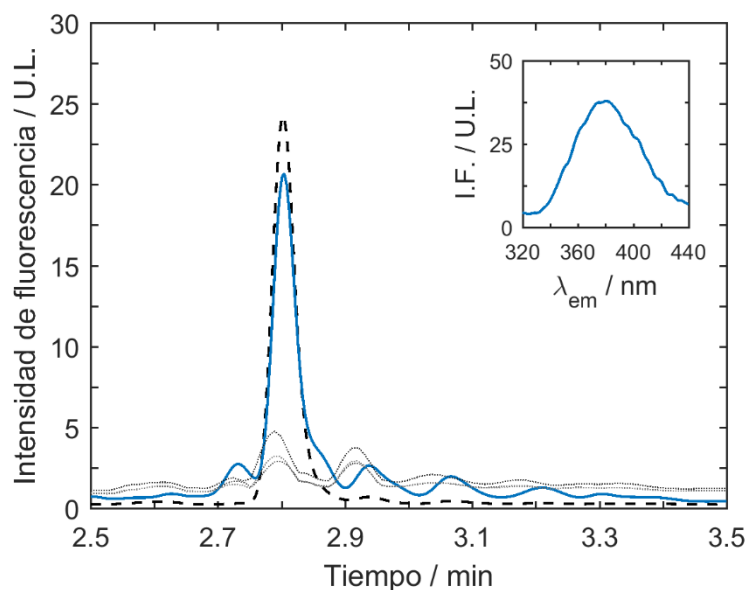


Figura 3.17. Cromatograma del extracto luego del procedimiento de limpieza, de una solución estándar de PMM (línea punteada negra) y de la muestra adicionada (línea continua azul). En línea punteada gris se muestran las soluciones de lavado. En el recuadro se muestra el espectro de emisión de fluorescencia obtenido en cubeta para el extracto de la muestra adicionada.

Al realizar la comparación de la señal de PMM obtenida en el extracto final con el de una solución estándar de igual concentración (Figura 3.12), se observan diferencias tanto en la intensidad como en la posición de los máximos de excitación y emisión. Considerando los resultados obtenidos, y buscando evitar pasos de extracción adicionales, se propuso una estrategia quimiométrica para completar el desarrollo del método y su aplicación para el análisis de muestras reales.

3.2.3.4. Modelado por PARAFAC y estandarización

Dada la presencia del efecto matriz evidenciado en la etapa de desarrollo del procedimiento de extracción, se planteó la necesidad de implementar una estrategia adecuada que permita la cuantificación de residuos de PMM en muestras de granos de maíz. Frente a esta situación, surgen diferentes opciones que permiten sobrellevar la problemática, como el método de adición estándar, pero que podrían implicar mayor tiempo de análisis o mayor consumo de solventes, si se considera las diferentes etapas de preparación de muestra. Por este motivo, se propuso un enfoque quimiométrico para minimizar el número de experimentos, principalmente en la etapa de preparación de muestra, y modelar el cambio en la señal como resultado del efecto matriz. La secuencia de procesamiento de datos aplicada se muestra en la Figura 3.18 en la que

se distinguen tres grandes etapas, incluyendo un modelado con PARAFAC para obtener los perfiles puros, la estandarización por PDS y un segundo modelado con PARAFAC para la predicción de la concentración de PMM en las muestras.

En primer lugar, se generó un arreglo de tres vías con las 3 matrices de muestras de estandarización, las 3 matrices de muestras fortificadas, por duplicado, y la matriz de la muestra real, por duplicado, obteniéndose un arreglo de $31 \times 262 \times 11$. La descomposición por PARAFAC se llevó a cabo para 4 factores y restricción de no negatividad en los tres modos. Se obtuvieron los perfiles espectrales puros, con los que se reconstruyeron las EEMs de las muestras de estandarización y se desdoblaron en vectores de dimensiones 1×8122 para la estandarización. El mismo procedimiento se aplicó para obtener los perfiles puros de PARAFAC de las muestras de calibración en solvente. Se generó un arreglo de $31 \times 262 \times 15$ para las 15 muestras de calibración y se llevó a cabo la descomposición para 1 factor y restricción de no negatividad en los tres modos. Se reconstruyeron las EEMs con los perfiles obtenidos y se desdoblaron en vectores de 1×8122 para la estandarización. Los perfiles obtenidos mediante PARAFAC se muestran en la Figura 3.19, en la que se pueden comparar las respuestas obtenidas de PMM en solvente y en la matriz de muestra, quedando expuestos los cambios que sufren los espectros en posición y forma cuando el analito se encuentra rodeado por determinados componentes del grano de maíz.

Posteriormente, los vectores obtenidos con los perfiles espectrales puros se emplearon para modelar la matriz de transformación en la etapa de PDS. En primer lugar, se construyó una matriz de 6×8122 con los vectores correspondientes a las muestras de calibración en solvente y en matriz de muestra. Se modeló la matriz de transformación **F** usando una ventana de tamaño 5 y se empleó para la estandarización de las 15 muestras de calibración.

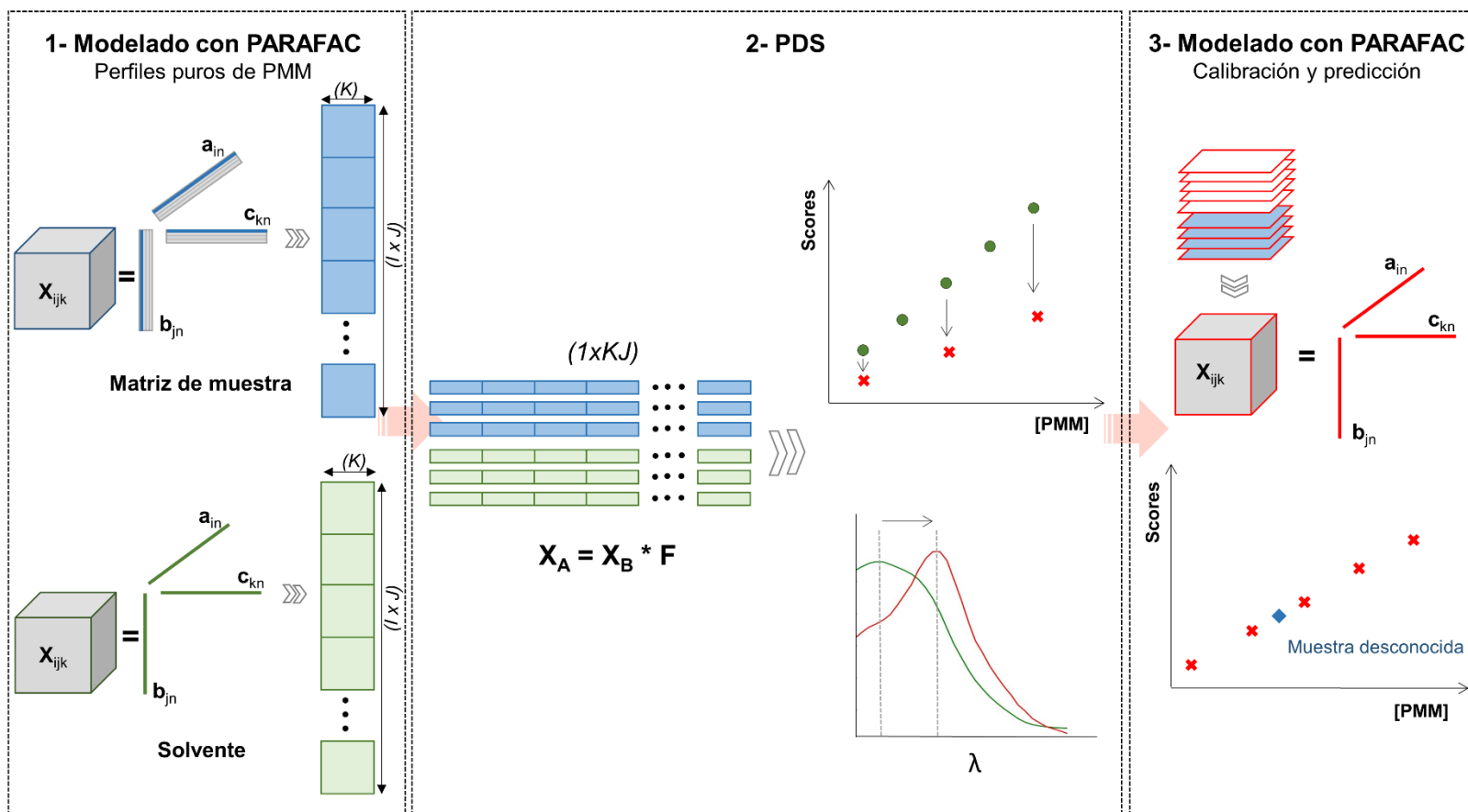


Figura 3.18. Esquema de tratamiento de datos para la estandarización, calibración y predicción de PMM en muestras de maíz.

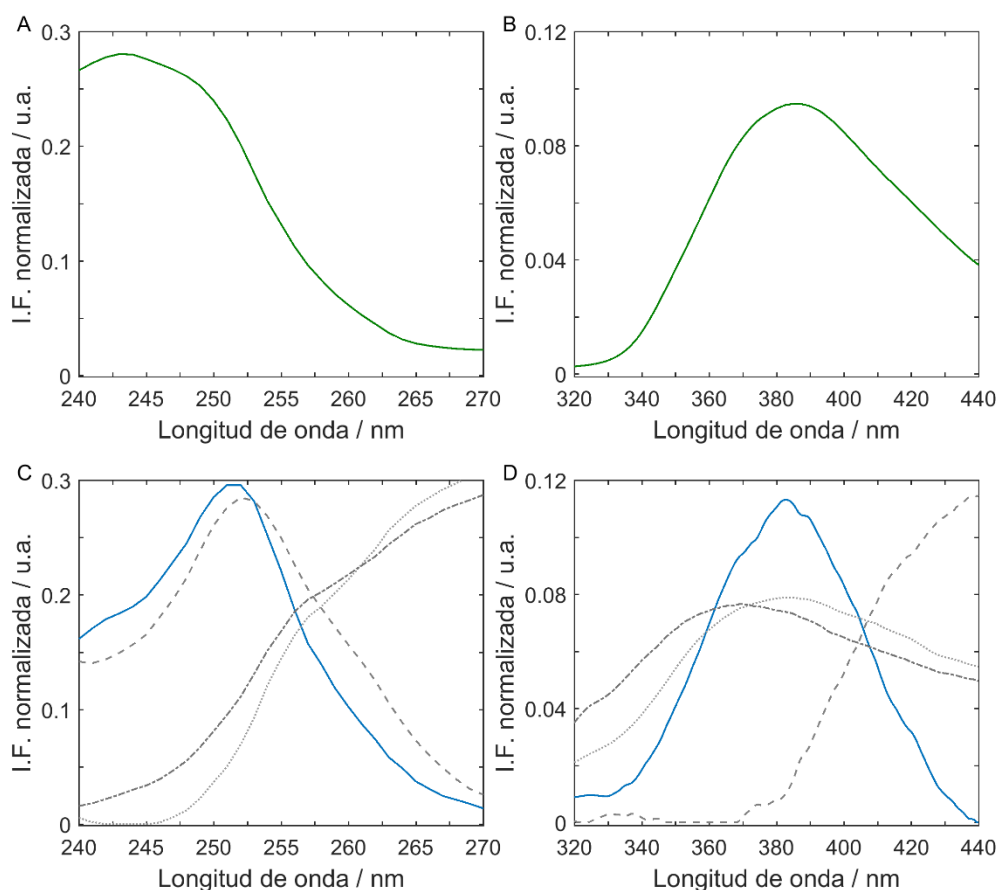


Figura 3.19. Perfiles de PARAFAC de excitación (A y C) y de emisión (B y D), de la solución de PMM en solvente (línea continua verde) y de la muestra adicionada (PMF: línea continua azul; interferentes de la matriz: líneas punteadas grises).

Para el último paso, se generó un arreglo de 3 vías con las 15 matrices de las muestras de calibración estandarizadas, las 6 matrices de las 3 muestras adicionadas por duplicado y las 2 matrices de la muestra real por duplicado. La descomposición se logró empleando 4 factores y la restricción de no negatividad en los 3 modos. Se obtuvieron las predicciones de concentración de PMM en las muestras adicionadas y en la muestra real, y las estimaciones de cifras de mérito analíticas, presentados en la Tabla 3.8.

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar las ventajas aportadas por el esquema de procesamiento de datos propuesto, se emplearon las 3 muestras de estandarización como muestras de calibración. Es decir, se construyó un arreglo con las 3 matrices de las muestras de estandarización, las 3 muestras adicionadas y la muestra real, y se llevó a cabo la descomposición por PARAFAC para obtener los valores de concentración de PMM predichos y las estimaciones de cifras de mérito analíticas. En la Tabla 3.8 se muestran los resultados de ambos modelos, estandarizado y no estandarizado. Por un lado, las recuperaciones promedio obtenidas para las 3 muestras adicionadas fueron similares para los dos modelos, teniendo valores de 117.5 y 115.8 % para los modelos

no estandarizado y estandarizado, respectivamente. Sin embargo, al evaluar las cifras de mérito se puede ver una mejora significativa, lográndose valores de LOD y LOQ de 3 and 10 ng mL⁻¹, correspondientes a 6 y 20 ng g⁻¹ respectivamente, más de 15 veces menores a los obtenidos con el modelo no estandarizado. No solo dichos valores son adecuados para el análisis de residuos de PMM considerando los límites establecidos por los organismos de control, sino que son significativamente menores y permiten detectar la presencia del plaguicida en concentraciones del orden de las partes por trillón. Si bien la regulación permite niveles mayores, el estudio de la toxicidad de los plaguicidas en uso se encuentra en constante desarrollo, y resulta importante disponer de métodos que permitan la detección a niveles cada vez menores para poder asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos de consumo humano o animal.

Tabla 3.8. Resultados de predicción por PARAFAC en muestras adicionadas y en una muestra real. Cifras de mérito obtenidas para los dos modelos estudiados.

Muestra	Nominal	Concentración de PMM (ng mL ⁻¹)					
		Modelo no estandarizado			Modelo estandarizado		
		Predicción	SD	RSD (%)	Predicción	SD	RSD (%)
M1 ^a	0	ND	-	-	ND	-	-
M2	100.0	D-NQ	-	-	110	10	9.1
M3	250.0	250	10	4.0	250	10	4.0
M4	400.0	540	50	9.3	550	50	9.1
Recuperación promedio			117.5 %		115.8 %		
Cifras de mérito							
SEN (AU ng ⁻¹ mL)			3.8		5.1		
LOD (ng mL ⁻¹)			54		3		
LOQ (ng mL ⁻¹)			160		10		

ND: no detectable; D-NQ: detectable no-cuantificable; SD: desviación estándar (N=2); RSD: desviación estándar relativa.

^a ND por análisis mediante UHPLC.

La mejora puede ser explicada teniendo en cuenta el número de muestras empleadas para construir el modelo de calibración en cada caso. En el modelo no estandarizado se usaron 3 muestras para 3 niveles de concentración, mientras que en el estandarizado se consideraron 15 muestras de calibración para 5 niveles de concentración por triplicado. Cabe destacar que en ambos casos el número de muestras procesadas y analizadas experimentalmente fue el mismo, siendo la única diferencia los pasos adicionales de tratamiento de datos. Teniendo en cuenta esto, se

considera que se podrían obtener mejores resultados, comparables a los del modelo estandarizado y con menor número de pasos de procesamiento de los datos, empleando 15 muestras de calibración preparadas por adición de PMM a una muestra de maíz en 5 niveles por triplicado. Sin embargo, esto implicaría un elevado consumo de solventes, un desarrollo experimental laborioso y un mayor tiempo de análisis total.

3.2.3.5. Validación del método

La validación del método desarrollado se llevó a cabo a través del análisis de efecto matriz, linealidad, precisión y exactitud, sensibilidad, LOD, LOQ y selectividad. Estos parámetros fueron descritos brevemente en secciones anteriores para la comparación de los modelos estudiados y se describen en mayor detalle a continuación.

En primer lugar, se compararon las pendientes de las curvas de regresión correspondientes a la calibración en solvente (ρ_1) y en matriz (ρ_2) para evaluar el efecto matriz. Para ello, se aplicó la prueba estadística t mediante el cálculo del valor de t experimental (t_{exp}) y su comparación con el valor de t crítico (t_c). La hipótesis nula (H_0 : $\rho_1 = \rho_2$) fue rechazada para un nivel de confianza del 95 % y 14 grados de libertad, considerando que el $t_{\text{exp}} = 19.3$ excedió el $t_c = 2.14$, permitiendo confirmar la presencia de efecto matriz. Adicionalmente, el efecto matriz se detectó por evaluación visual de los espectros de excitación y emisión, mostrados en la Figura 3.19, en la que se evidencian las diferencias en los perfiles espectrales de excitación y emisión de PMM en solvente y en presencia de componentes de la matriz. Por este motivo, se aplicó la estrategia de estandarización explicada previamente y, luego, se evaluó la curva de calibración obtenida con las muestras estandarizadas.

En segundo lugar, se evaluó la linealidad a partir de la curva de calibración construida. El análisis de los residuos en función de la concentración permitió confirmar la homocedasticidad de los datos en el rango de concentración estudiado. Considerando este resultado, se llevó a cabo la regresión por cuadrados mínimos ordinarios para obtener la curva de calibración pseudo-univariada y los coeficientes de regresión, con los *scores* obtenidos luego de la descomposición por PARAFAC de las muestras de calibración estandarizadas. A continuación, se aplicó el test de linealidad F , para el que se obtuvo el valor experimental de F (F_{exp}), correspondiente a la varianza al cuadrado residual del error puro, y se comparó con el valor crítico F (F_c). La hipótesis nula (H_0 : los datos son lineales) fue aceptada para un nivel de confianza del 95 % y 13 y 10 grados de libertad para el numerador y denominador, respectivamente, considerando que el valor $F_{\text{exp}} = 2.37$ no excedió el valor $F_c = 2.89$.

Posteriormente, se evaluaron la precisión y la exactitud del método mediante el análisis de la recuperación de muestras fortificadas con PMM. En la Tabla 3.8 se observan los valores de recuperación promedio, la desviación estándar y la desviación estándar relativa obtenidos. Además, se calcularon las regiones elípticas de confianza conjunta (EJCR) con los resultados de predicciones obtenidos para las muestras fortificadas, con los modelos estandarizado y no estandarizado. El resultado, presentado en la Figura 3.20, muestra que el punto ideal (pendiente=1, ordenada=0) se encuentra incluido dentro de la elipse en ambos casos, demostrando la exactitud del método. Adicionalmente, el análisis de las EJCR puede emplearse para demostrar la mayor precisión del modelo estandarizado propuesto, lo que se ve reflejado en la menor área representada por su elipse.¹⁰⁰

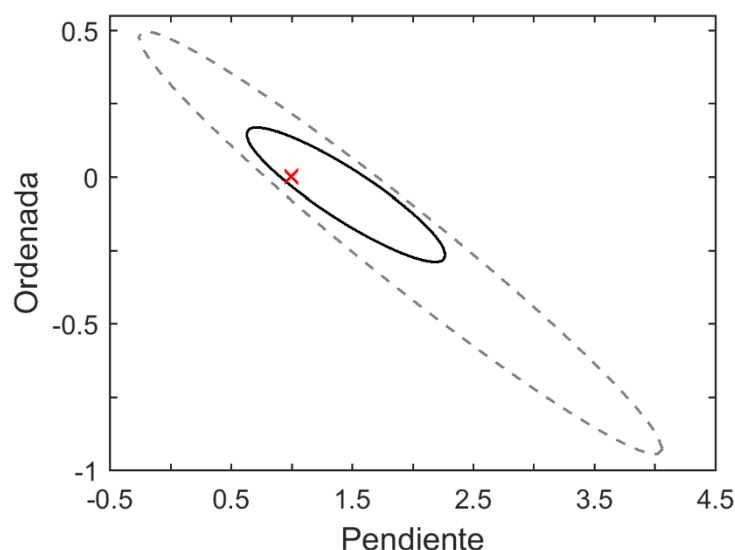


Figura 3.20. EJCR obtenidas para los valores de predicción de muestras adicionadas con PMM, empleando el modelo estandarizado (línea continua negra) y no estandarizado (línea discontinua gris).

Finalmente, se calcularon las cifras de mérito analíticas considerando el esquema de calibración multivariada. Olivieri²⁵ propuso una nueva expresión para el cálculo de la sensibilidad en la calibración multi-vía en términos de propagación de la incertidumbre, y que tiene en cuenta la definición tradicional de sensibilidad univariada y de primer orden. Por analogía con su equivalente univariado, los LOD y LOQ pueden estimarse a partir de la sensibilidad. Los resultados obtenidos para sensibilidad, LOD y LOQ a partir del modelado por PARAFAC se presentan en la Tabla 3.8.

Con respecto a la selectividad, la IUPAC la define como la medida en la que un método es capaz de determinar un analito en particular en una mezcla compleja, sin interferencia por parte de otros componentes.¹⁰¹ En este trabajo, la combinación del procedimiento de extracción y la estandarización espectral, en combinación con la ventaja de segundo orden,²² permitió modelar la presencia de compuestos interferentes. Por lo tanto, se logró la cuantificación exitosa de PMM en muestras de granos de maíz mediante modelado por PARAFAC de los datos de segundo orden.

3.2.4. Conclusiones

En este capítulo se presentó un método para la cuantificación de residuos de PMM en granos de maíz almacenados mediante espectroscopia de fluorescencia.

La sensibilidad del método pudo ser incrementada de manera considerable gracias al uso del surfactante Brij-35, que permitió la exaltación de la señal de fluorescencia a través de la inclusión de las moléculas de PMM en el interior hidrófobo de las micelas. El aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia en presencia Brij-35 fue ~5 veces mayor a la señal nativa de PMM en agua, implicando una notable mejora en el desempeño del método desarrollado. Es importante resaltar la relevancia de la mejora en la sensibilidad al tratarse de un método destinado al análisis de residuos de un compuesto potencialmente tóxico en un producto alimentario, lo que significa que los niveles de concentración esperados son considerablemente bajos y las implicancias de no poder detectarlos podrían ser de gravedad.

Con respecto al desarrollo del procedimiento de extracción, se llevó a cabo un exhaustivo estudio en relación al tratamiento de la muestra. No solo se lograron altos niveles de recuperación luego de la selección del solvente más adecuado, sino también se logró separar el analito de interés de determinados compuestos co-extraídos propios de la muestra que apagan la señal de fluorescencia, mediante la limpieza del extracto obtenido en la etapa anterior.

El efecto matriz se superó aplicando un esquema de tratamiento de datos que permitió reducir el número de pasos experimentales y, consecuentemente, el tiempo de análisis y el consumo de solventes. Además, se mejoraron considerablemente las cifras de mérito analíticas, obteniéndose límites de detección y cuantificación muy por debajo de los niveles requeridos de acuerdo a la regulación vigente.

En general, el método desarrollado emplea una técnica simple y menos costosa en comparación con los métodos de referencia, con buen desempeño analítico. La estrategia de análisis se presenta como una alternativa, no solo para la aplicación en el caso particular de estudio que aquí se presenta sino para ser considerada en casos similares cuando se enfrenta la problemática del efecto matriz en muestras complejas.

3.3. Cuantificación de metil-azinfos en frutas mediante modelado de arreglo de cuatro vías: matrices de excitación-emisión de fluorescencia inducida por fotoquímica

3.3.1. Consideraciones generales

El metil-azinfos (AZM) es un insecticida y acaricida de la familia de los organofosforados (OPPs), ampliamente utilizado en la protección de cultivos de manzanas, peras, duraznos, ciruelas, entre otros.¹⁶ Debido a su alta solubilidad en agua (30 mg L^{-1}),¹⁰² es considerado un tóxico de gran impacto ambiental, especialmente en cauces de aguas naturales y organismos acuáticos.^{103,104} El mecanismo de acción del AZM, al igual que todos los OPPs, es mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa del sistema nervioso y la consecuente acumulación del neurotransmisor acetilcolina, resultando tóxico tanto para insectos como para otros animales como aves, anfibios y mamíferos.⁸¹

Los niveles de residuos de AZM en productos agroalimentarios, al igual que para otros agroquímicos, se encuentran regulados por organismos de control a través de los LMRs permitidos. Por este motivo, es importante contar con métodos sensibles y confiables que permitan cuantificar AZM con exactitud, considerando, además, su elevada toxicidad. El LMR de AZM establecido por SENASA es de 0.2 mg L^{-1} .⁸²

La determinación de AZM en una variedad de muestras alimentarias se realiza principalmente mediante métodos cromatográficos. Entre las técnicas separativas

empleadas, acopladas a diferentes métodos de detección, se pueden mencionar la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detector de arreglo de diodos¹⁰⁵ y a detector de masa en tándem (MS/MS),¹⁰⁶ la cromatografía gaseosa acoplada a detector MS/MS^{107,108} y a detector de nitrógeno fósforo,^{109,110} y la cromatografía electrocinética micelar.¹¹¹ Si bien las técnicas hasta aquí mencionadas proveen resultados satisfactorios y confiables, requieren de instrumentación de alta complejidad que aumenta el costo del método. Las técnicas espectroscópicas, por su parte, emplean equipamiento de mediana complejidad, resultando más sencillas y económicas. Sin embargo, cabe mencionar que el AZM no presenta fuerte fluorescencia nativa en solución acuosa, por lo que los métodos para determinarlo mediante espectroscopia de fluorescencia emplean, además, estrategias que permiten exaltar o inducir su señal de emisión de fluorescencia.^{16, 112,113,114} Entre ellas pueden mencionarse la inclusión del soluto en la cavidad interna de diferentes tipos de ciclodextrinas,^{92,13} la generación de un producto fluorescente mediante fotólisis con irradiación UV¹⁸ y la hidrólisis en medio alcalino.¹¹⁵ En la literatura científica se encuentra explicada la foto-química de este importante plaguicida, en donde se proponen diferentes mecanismos de degradación mediada por luz.¹⁶ Yeasmin et al. describieron de manera detallada el mecanismo de fotólisis con radiación UV-A del AZM que involucra dos vías, la principal que lleva a la generación de benzazimida como producto final foto-estable, y la segunda que lleva a la generación de ácido N-metilantranílico como intermediario de reacción y, luego, a la anilina como producto final foto-estable.¹¹⁴ Además, se ha empleado la conversión de AZM a ácido antranílico catalizado en medio alcalino para su detección mediante fluorescencia para análisis de trazas.¹¹⁵

Este trabajo involucró la degradación del plaguicida AZM mediada por luz catalizada en medio alcalino y el monitoreo de la evolución de la reacción mediante matrices de excitación-emisión de fluorescencia para la generación de datos de tercer orden. Se propuso evaluar las ventajas del incremento del orden de los datos a partir del estudio de predicción de muestras de validación y de la estimación de cifras de mérito analíticas. Finalmente, el método desarrollado se aplicó al análisis de muestras reales de frutas.

3.3.2. *Materiales y métodos*

3.3.2.1. *Estándares, reactivos y muestras*

Todos los estándares empleados corresponden a grado analítico. Los estándares de AZM, fuberidazol (FBZ), tiabendazol (TBZ) y bitertanol (BTN) fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Estados Unidos). El MeOH grado LC y ACN grado LC, en Merck (Alemania), el cloroformo (CHCl_3) en Cicarelli (Argentina) y el NaOH en Anedra (Argentina). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q de Millipore (Estados Unidos).

Las muestras de manzana, pera y durazno se compraron en mercados locales de la ciudad de Santa Fe, Argentina.

3.3.2.2. Instrumentación

El análisis por espectroscopia de fluorescencia se llevó a cabo con un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent Technologies, Alemania) equipado con una lámpara de xenón. Las EEMs se registraron en una cubeta de cuarzo de 1.00 cm de paso óptico, empleando un compartimento conectado a un baño termostatzado O.R.L. (Hornos Eléctricos S.A., Argentina).

La radiación de las muestras se llevó a cabo empleando una fuente de energía lumínica pulsada de xenón Ocean Optics PX-2, con un rango espectral de entre 220 y 750 nm. La transmisión de la luz desde la fuente se logró mediante una fibra óptica conectada a la fuente lumínica y al portacubetas diseñado especialmente para este propósito. En la Figura 3.21 se muestra el esquema del sistema utilizado.

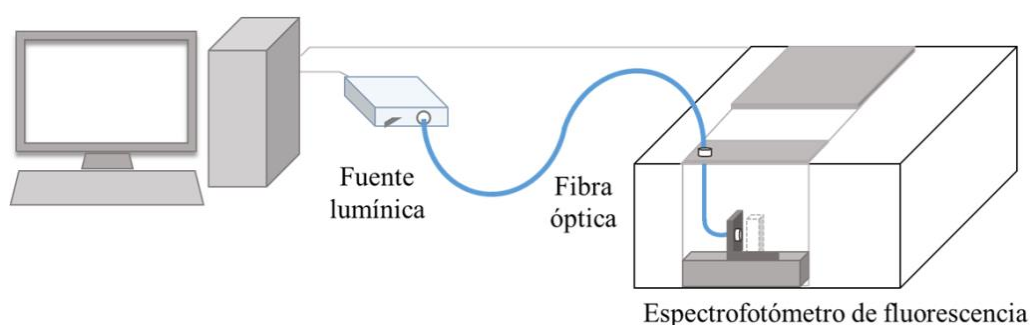


Figura 3.21. Esquema del instrumento para la generación de los datos.

3.3.2.3. Preparación de las soluciones de trabajo

Las soluciones estándares concentradas de AZM (476.0 mg L^{-1}), TBZ (700.0 mg L^{-1}), FBZ (300.0 mg L^{-1}) y BTN (500.0 mg L^{-1}) se prepararon disolviendo una masa pesada de cada sustancia en MeOH y se mantuvieron refrigeradas a 4°C protegidas de la luz. Las soluciones estándares de trabajo se prepararon diariamente por dilución de las soluciones concentradas en agua ultrapura.

Se prepararon 15 muestras de calibración, en 5 niveles de concentración de AZM por triplicado, transfiriendo una alícuota apropiada de una solución estándar intermedia de AZM a un matraz 2.0 mL y llevando a volumen final con agua ultrapura. El rango de concentración empleado fue de $0.0 - 70.0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Por otro lado, se prepararon 12 muestras de validación, en 3 niveles de concentración de AZM por triplicado. Además, se agregaron los pesticidas FBZ ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$), TBZ ($10.0 \mu\text{g L}^{-1}$) y BTN ($10.0 \mu\text{g L}^{-1}$) como interferencias no calibradas, de manera de evaluar la ventaja de segundo orden. Las concentraciones de las muestras de validación se muestran en la Tabla 3.9.

Para la cuantificación de AZM en manzana, durazno y pera se llevó a cabo el método de adición estándar. Se evaluó la recuperación de AZM adicionando en dos niveles y se determinó la concentración de AZM en las muestras sin adición. Para ello, se preparó una curva de calibrado adicionando la muestra en tres niveles de AZM (C1, C2 y C3). Para evaluar la recuperación, se prepararon dos muestras adicionadas en dos niveles de AZM (R1 y R2) y sobre cada una de ellas se realizaron las adiciones (C1, C2 y C3) para obtener la curva de calibrado. Las concentraciones de AZM empleadas para cada muestra fueron las siguientes:

Manzana ($\mu\text{g L}^{-1}$): C1- 150, C2- 200, C3- 250, R1- 150 y R2- 250.

Durazno ($\mu\text{g L}^{-1}$): C1- 100, C2- 120, C3- 150, R1- 120 y R2- 150.

Pera ($\mu\text{g L}^{-1}$): C1- 150, C2- 200, C3- 250, R1- 200 y R2- 250.

3.3.2.4. Procedimiento de extracción

Para el análisis de muestras reales se aplicó un procedimiento de extracción basado en un método desarrollado y descrito en la bibliografía.¹¹⁶ Se aplicó el método de adición estándar, luego de comprobarse la presencia de efecto matriz debido a los compuestos de la matriz de las muestras.

En primer lugar, las muestras de manzana, pera y durazno se procesaron individualmente utilizando una licuadora de alimentos, obteniéndose un jugo compuesto por la fruta completa. La adición de AZM se llevó a cabo sobre el jugo de fruta, agregando un volumen apropiado de una solución estándar intermedia de AZM sobre 5.0 mL de jugo.

El procedimiento de extracción consistió en la combinación de dos reconocidos métodos, QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*)¹¹⁷ y micro-extracción líquido-líquido dispersiva (DLLME: *Dispersive liquid-liquid micro-extraction*).¹¹⁸ A continuación se describen brevemente ambos procedimientos individuales y la combinación aplicada en el presente caso.

QuEChERS: consiste en dos pasos, el primero de extracción con solvente orgánico y el segundo de limpieza. En el método tradicional se emplea ACN como solvente de extracción, pudiendo utilizarse un solvente diferente de acuerdo a la muestra y al analito que se desea extraer. En el segundo paso, que corresponde a la etapa de limpieza del extracto orgánico mediante extracción en fase sólida dispersiva, se emplean diferentes sorbentes dispersivos de acuerdo a la composición de la muestra, como C-18, GCB (*Graphitized Carbon Black*) o PSA (*Primary secondary amine*).

DLLME: la extracción se lleva a cabo empleando un sistema ternario de solventes. Consiste en el agregado de una mezcla apropiada de un solvente de extracción, como CHCl_3 o tetracloruro de carbono, y un solvente dispersivo, como ACN o MeOH, inyectados rápidamente a una solución acuosa. De este modo, se forma una solución turbia, compuesta por las microgotas de solvente de extracción dispersas en la solución acuosa.

QuEChERS-DLLME: el procedimiento aplicado en este trabajo consistió en la combinación del primer paso de extracción QuEChERS seguido de la DLLME. En un primer paso, se mezclaron 5.0 mL de ACN con 5.0 mL de jugo de fruta. A continuación, se agregaron 2.0 g de MgSO_4 y 0.5 g de NaCl para inducir la separación entre la fase acuosa y la fase orgánica por precipitación salina y obtener, luego de la centrifugación, la fase orgánica conteniendo el compuesto de interés. En un segundo paso, se transfirieron 2.0 mL del extracto orgánico obtenido a un tubo conteniendo 5.0 mL de agua ultrapura. A continuación, se adicionaron rápidamente 200.0 μL de CHCl_3 , formando una dispersión de gotas de CHCl_3 en la solución acuosa. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min y se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm. Finalmente, se extrajo la gota de CHCl_3 depositada en el fondo del tubo con una jeringa de 500.0 μL , y se la transfirió a

un tubo de vidrio limpio. El CHCl_3 se evaporó utilizando un flujo de nitrógeno y el residuo seco se disolvió en 2.0 mL de agua ultrapura.

3.3.2.5. Generación de los datos

Se registraron las EEMs de cada una de las muestras analizadas variando las longitudes de onda de excitación en el rango espectral comprendido entre 220 y 320 nm, con $\Delta\lambda_{\text{ex}}=5$ nm, y registrando el espectro de emisión en el rango espectral entre 320 y 500 nm, con $\Delta\lambda_{\text{em}}=5$ nm, a una velocidad de $24000 \text{ nm min}^{-1}$. El voltaje del fotomultiplicador se estableció en 600 V y las aperturas de rendijas de excitación y emisión en 10 nm.

Para la generación de los datos de tercer orden se registraron las EEMs a diferentes tiempos de irradiación. Para ello, se transfirieron 2.0 mL de solución muestra a una cubeta y se adicionaron $20.0 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ para iniciar la reacción, registrando la EEM a $t=t_0$. Seguidamente, se comenzaron ciclos de irradiación de 30 s, registrando las EEMs luego de cada uno de ellos. La reacción se llevó a cabo durante seis minutos, obteniéndose en total 13 EEMs (21×33) por muestra.

3.3.2.6. Programas informáticos

Para el control del espectrofotómetro de fluorescencia y la recolección de datos se empleó el paquete informático de Cary Eclipse. Todos los algoritmos usados se implementaron en MATLAB 7.6. Los algoritmos de segundo y tercer orden se implementaron utilizando las interfaces gráficas MVC2 y MVC3, disponibles en la página web www.iquir-conicet.gov.ar/descargas, desarrolladas por Olivieri y et al.^{99,119}

3.3.3. Resultados

3.3.3.1. Generación de los datos

Se realizaron estudios previos que permitieron establecer las condiciones para la generación de los datos y llevar a cabo, posteriormente, la calibración y el análisis de muestras reales. Para ello, se analizó el comportamiento de la señal de fluorescencia de una solución de AZM 0.025 mg L^{-1} en medio alcalino frente a la irradiación con luz UV. Se registraron los espectros de excitación ($\lambda_{em}=390 \text{ nm}$) y de emisión ($\lambda_{ex}=240 \text{ nm}$) de fluorescencia cada 2 min de irradiación, durante 20 min, a una temperatura de 25°C . El comienzo del aumento de la señal de fluorescencia se evidenció en el primer punto de tiempo luego de comenzada la irradiación (2 min), alcanzando una intensidad de fluorescencia 15 veces mayor a la inicial transcurridos los 20 min. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se estableció un tiempo de reacción de 6 min para la generación del dato, considerando que la aplicación para la que se deseaba desarrollar el método implicaba el análisis de un número considerable de muestras, incluyendo muestras de calibración, validación y muestras reales. Por lo tanto, la reacción se llevó a cabo en medio alcalino a temperatura ambiente durante 6 min, registrando las EEMs cada 30 s, obteniendo $21 \times 33 \times 13$ puntos de datos por muestra. Antes del modelado, las dimensiones de las EEMs se ajustaron para eliminar la señal de dispersión de Rayleigh, obteniéndose $14 \times 24 \times 13$ puntos de datos por muestra.

En la Figura 3.22 se muestra la evolución de la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{ex}=240 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=390 \text{ nm}$) junto con las EEMs registradas a 0, 2, 4 y 6 minutos de comenzada la reacción para una solución de AZM 0.025 mg L^{-1} . El análisis de la figura permite no sólo conocer el perfil de cinética del AZM en las condiciones experimentales empleadas, sino también comprender las potenciales ventajas aportadas al incluir el modo temporal. En principio, la sensibilidad en la determinación de AZM por espectroscopia de fluorescencia podría ser aumentada al registrar la EEM del compuesto degradado, es decir, al final de la reacción descrita, considerando su mayor señal de fluorescencia. Sin embargo, el uso de toda la información registrada a lo largo de la reacción podría aportar mejoras adicionales reflejadas no solo en un aumento aun mayor de la sensibilidad, sino también en el incremento de la selectividad y capacidad predictiva del modelo. Teniendo en cuenta la hipótesis planteada, se propuso el análisis del dato de segundo orden, usando las EEMs registradas al final de la reacción de degradación, y del dato de tercer orden, empleando las 13 EEMs registradas a cada tiempo de reacción, y la comparación de los resultados obtenidos.

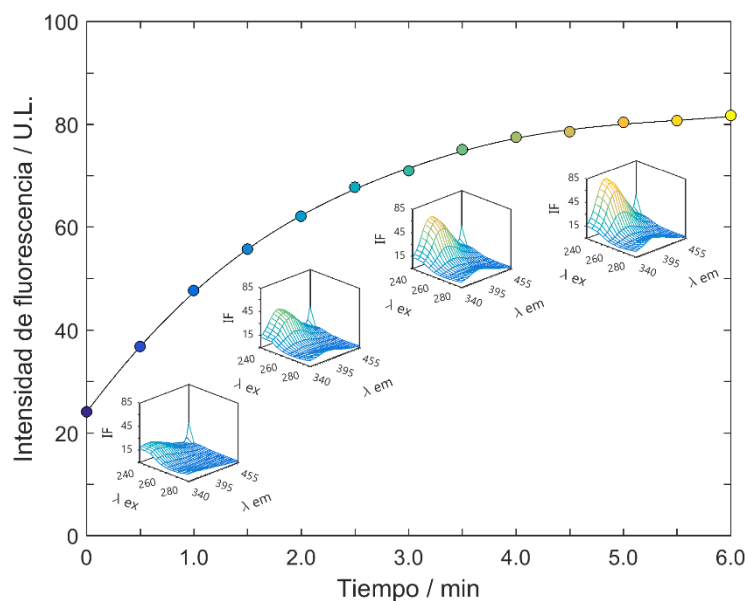


Figura 3.22. Evolución de la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex}=240$ nm/ $\lambda_{em}=390$ nm) de AZM en medio alcalino en función del tiempo de irradiación. Se muestran las EEMs obtenidas a $t=0, 2, 4$ y 6 min.

3.3.3.2. Modelados de datos de segundo y tercer orden

Los datos obtenidos se modelaron con los algoritmos PARAFAC y U-PLS, evaluándose los resultados de predicciones de concentración de AZM en presencia de componentes no calibrados. En el caso de U-PLS, se aplicó en combinación con el algoritmo RBL o RTL, para segundo y tercer orden, respectivamente.

Para el modelado se construyeron dos arreglos de datos:

Modelo I: se construyó un arreglo de tres vías con los datos de segundo orden de dimensiones 14×21 , combinando las matrices del juego de 15 muestras de calibración más 1 muestra de validación, obteniéndose un arreglo de dimensiones de $16 \times 14 \times 21$.

Modelo II: se construyó un arreglo de cuatro vías con los datos de tercer orden, combinando el dato generado de dimensiones $14 \times 21 \times 13$ para el juego de 15 muestras de calibración más 1 muestra de validación, obteniéndose un arreglo de dimensiones $16 \times 14 \times 21 \times 13$.

El primer paso para el modelado por PARAFAC consiste en la determinación del número de factores, para lo que se aplicó el análisis de CORCONDIA, obteniéndose un valor de 4 factores necesarios para el ajuste de ambos modelos. Los factores corresponden al producto de degradación del AZM y a los pesticidas FBZ, TBZ y BTN agregados como interferencias no calibradas. Si bien el AZM se encuentra inicialmente

presente en la mezcla, produciendo un nuevo compuesto luego de la degradación, su fluorescencia nativa es muy baja y no se logra detectar en las concentraciones estudiadas.

Una vez seleccionado el número de factores, se obtuvieron los perfiles espectrales y de cinética puros para cada componente aplicando la restricción de no negatividad en los tres o cuatro modos, para los Modelos I y II, respectivamente. En la Figura 3.23 se muestran los perfiles obtenidos luego de la descomposición de los datos de tercer orden (Modelo II), superpuestos con los perfiles reales obtenidos para las soluciones estándares de los compuestos puros. En dicha figura puede observarse el alto grado de solapamiento de los espectros, lo que indica una buena resolución de los perfiles lograda por la descomposición de los datos con el algoritmo implementado. Se observa, además, la gran similitud en los perfiles espectrales de excitación del producto de degradación del AZM y dos de los tres compuestos agregados como interferencias no calibradas. En cuanto al perfil temporal, se muestra una clara diferencia entre el AZM, cuya intensidad de fluorescencia aumenta con el tiempo de reacción, y los demás compuestos, cuyas señales se mantienen constantes.

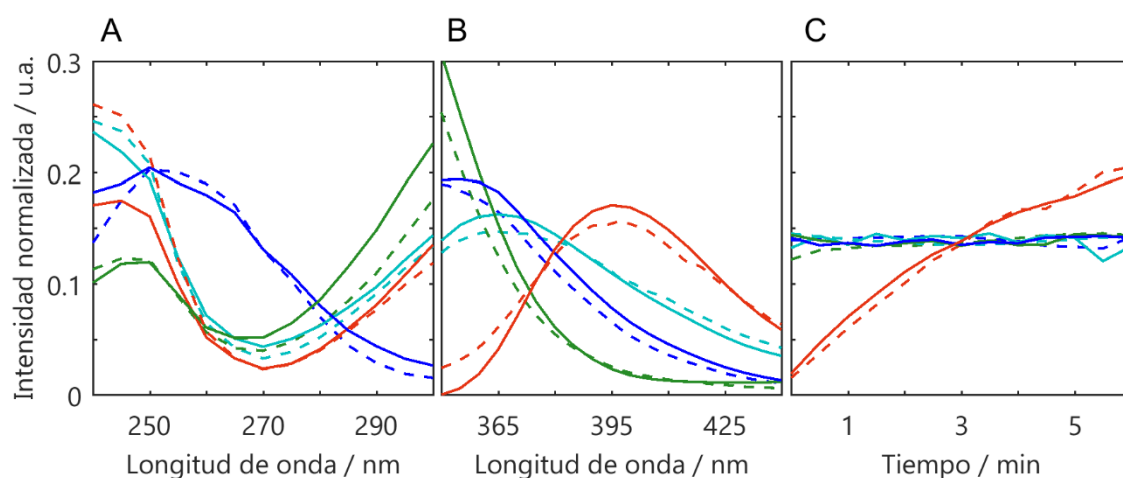


Figura 3.23. Perfiles espectrales de excitación (A), emisión (B) y temporales (C) obtenidos para soluciones estándares puras y por PARAFAC para una muestra de validación (Perfiles reales: líneas punteadas; perfiles de PARAFAC: líneas continuas. AZM: rojo; BTN: azul; FBZ: celeste; TBZ: verde)

Para el modelado con U-PLS se seleccionó el número de variables latentes mediante el procedimiento de validación cruzada. El número óptimo de variables latentes resultó ser dos para ambos modelos, atribuidos al producto de degradación de AZM y al AZM

o un mayor nivel de ruido. A diferencia de lo obtenido en el modelado por PARAFAC, en donde el AZM se modeló con un factor correspondiente al producto de degradación, U-PLS requirió de dos variables latentes para explicar la mayor variabilidad en las muestras de calibración.

Por otro lado, se aplicó el algoritmo RBL y RTL para los modelos I y II, respectivamente, para los que fue necesario contemplar dos componentes. La selección del número correcto de componentes para modelar la señal de los compuestos interferentes no calibrados (M_i) se realizó por evaluación de los residuos finales s_u en función de M_i (Ecuación 9), eligiendo un N para el cual s_{UPLS} se mantuvo estable a un valor comparable con el ruido experimental. Para las muestras de validación analizadas los residuos evolucionaron de la siguiente manera: 77.5 ($i=0$), 20.7 ($i=1$), 11.9 ($i=2$) y 9.5 ($i=3$). El ultimo valor no solo no representa una reducción significativa del residuo sino que no provee buenos resultados de predicción de la concentración de AZM en las muestras de validación. Por este motivo, se emplearon dos componentes de RBL o RTL para los modelados I y II, respectivamente, de los datos correspondientes a las muestras de validación y la obtención de los resultados de predicción.

En la Tabla 3.9 se muestran los resultados de las predicciones y el análisis de las recuperaciones correspondientes a las muestras de validación para los Modelos I y II. Los valores de concentraciones predichos por los modelos fueron satisfactorios en todos los casos, obteniéndose recuperaciones de entre 75 y 125 %. Sin embargo, se observa una mejora cuando se aplica el modelado de tercer orden, en especial, cuando se aplica el algoritmo U-PLS/RTL, cuyos valores de recuperación oscilan entre 92 y 116 %. Para una correcta evaluación de los resultados, se aplicó una prueba de hipótesis para determinar si las recuperaciones promedio obtenidas son significativamente diferentes de 100 %. La hipótesis nula ($H_0: \bar{R}=100\%$) fue aceptada para un 95 % de confianza en todos los casos.

El sistema propuesto para la generación de datos multidimensionales y su posterior modelado resulta adecuado para el fin propuesto de determinación de residuos de AZM, lo que se comprobó a través del análisis de muestras de validación y la correcta evaluación de los resultados obtenidos. Se logró demostrar que es posible cuantificar AZM en presencia de compuestos no calibrados, lo que representa una ventaja de especial relevancia en el análisis de muestras complejas. Por otro lado, las concentraciones estudiadas se encuentran en niveles adecuados si se tienen en cuenta los límites establecidos por los organismos de control.

Tabla 3.9. Resultados de predicciones por PARAFAC y U-PLS/RTL en muestras de validación

Nominal	Segundo Orden				Tercer Orden			
	PARAFAC		U-PLS/RBL		PARAFAC		U-PLS/RTL	
	Predicción	Recup. (%)	Predicción	Recup. (%)	Predicción	Recup. (%)	Predicción	Recup. (%)
10.0	7.6	76	9.8	98	10.9	109	11.0	110
10.0	10.3	103	8.6	86	10.9	109	9.2	92
10.0	8.8	88	9.0	90	9.9	99	11.6	116
25.0	20.7	83	20.4	82	21.2	85	24.9	100
25.0	20.9	84	20.4	82	23.3	93	26.0	104
25.0	25.3	101	23.5	94	23.8	95	25.3	101
35.0	30.3	86	28.9	83	31.6	90	33.4	95
35.0	37.4	107	40.8	117	39.2	112	40.2	115
35.0	40.7	116	43.3	124	40.6	116	36.6	105
45.0	43.6	97	43.3	96	42.5	94	47.3	105
45.0	43.9	98	42.1	94	43.1	96	45.2	100
45.0	46.4	103	45.1	100	46.2	103	48.2	107
REP (%)	9		12		8		6	

Estudio de recuperación ^a

\bar{R} (%)	95	95	100	104
t_{exp}	1.4	1.3	0	2.0
$t_{(0.05,11)}$	2.2	2.2	2.2	2.2

3.3.3.3. Análisis de muestras reales

Antes de procesar muestras reales, se llevó a cabo el estudio de la respuesta de AZM en presencia de los componentes propios de cada matriz a ser analizada. Para ello, se realizó la adición de AZM sobre cada una de las muestras y se registraron las EEMs a diferentes tiempos de irradiación, de la misma manera que se realizó para las muestras de calibración y validación en medio acuoso. La comparación de los resultados permitió evidenciar diferencias en la respuesta de AZM, indicando la presencia de efecto matriz. El efecto matriz observado se encuentra asociado a cambios en los perfiles espectrales dados por corrimientos de las longitudes onda de los máximos de excitación y emisión, y variaciones en la intensidad de fluorescencia. Estos cambios se ven reflejados en los perfiles puros obtenidos por PARAFAC, cuando se comparan los perfiles presentados en la Figura 3.23 con los de la Figura 3.24. Por este motivo, los modelos de calibración obtenidos en la primera etapa, con los que se obtuvieron las concentraciones de AZM en las muestras de validación, no pudieron ser aplicados a la predicción de concentración de AZM en las muestras reales, ya que se obtendrían resultados erróneos afectados por los componentes de la matriz. No obstante, el sistema propuesto es válido para el análisis de residuos de AZM en muestras incógnitas, si se comprueba la ausencia de efecto matriz. En el presente caso, se propuso la aplicación del método de adición estándar para seguir con el análisis y poder implementar el sistema de generación y modelado de datos a la cuantificación de AZM en muestras reales. El procedimiento experimental para la generación de los datos, como así también la implementación de los algoritmos quimiométricos para su modelado mostrados previamente, fueron los mismos.

El método consistió en la adición de tres niveles de concentraciones de AZM a cada una de las muestras sin adición de AZM y a cada una de las muestras adicionada en dos niveles, preparadas como se detalló en la sección 3.3.2.3. En base a los resultados obtenidos para los diferentes modelos, se continuó con el análisis de tercer orden por PARAFAC y U-PLS para predecir concentraciones de AZM en muestras reales evaluando las recuperaciones.

El modelado por PARAFAC se llevó a cabo con 5 factores para las muestras de pera y durazno y 4 factores para la muestra de manzana, y restricción de no negatividad en los 4 modos. A partir del modelado se obtuvieron los 3 perfiles de los componentes puros presentes en la muestra, es decir, los perfiles espectrales de excitación y emisión y el perfil de cinética correspondientes al compuesto de degradación del AZM y a los compuestos interferentes propios de la matriz de la muestra. En la Figura 3.24 se

muestran los tres perfiles obtenidos por PARAFAC para una muestra adicionada de durazno. Por otro lado, se obtuvieron los valores de predicciones de concentración de AZM en cada una de las muestras adicionadas, los que se presentan en la Tabla 3.10.

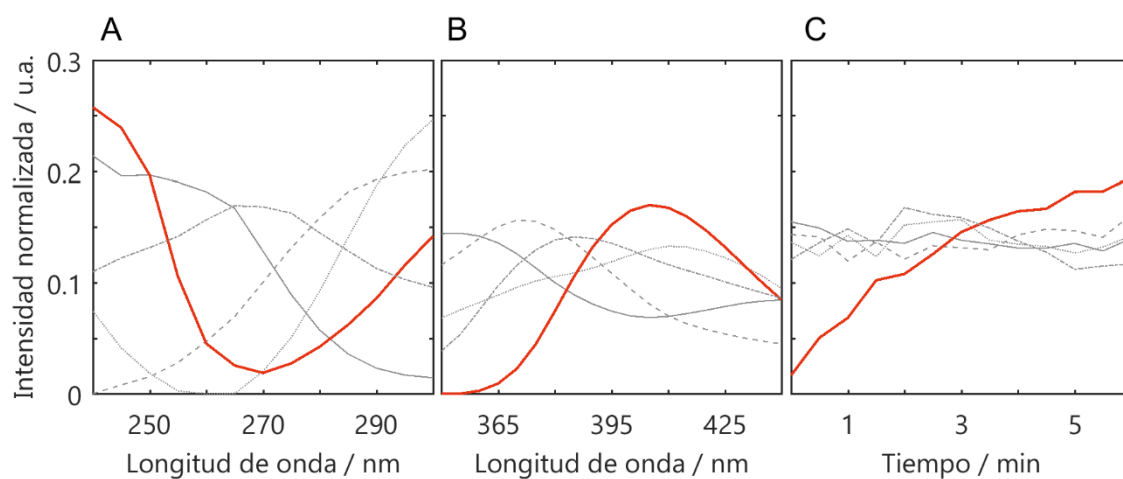


Figura 3.24. Perfiles espectrales de excitación (A), emisión (B) y temporales (C) obtenidos para una muestra de durazno adicionada (AZM: línea roja; componentes de la matriz: líneas grises)

En la Tabla 3.10 se muestran los resultados de predicción y recuperación obtenidos para las muestras de manzana, durazno y pera analizadas. Las recuperaciones promedio fueron de 101 y 93%, siendo en todos los casos mayor a 80 %. En cuanto a las muestras reales sin adición analizadas, el nivel de AZM resultó no detectable en pera y manzana, pero en el caso del durazno se detectó la presencia del pesticida en niveles por debajo de LOQ, por lo que no pudo ser cuantificado. Sin embargo, teniendo en cuenta que el LOQ obtenido para este método es de $63 \mu\text{g L}^{-1}$ (ver sección 3.3.3.2), se entiende que la concentración de residuo de AZM no supera el límite legal establecido por SENASA.

Tabla 3.10. Resultados de predicciones por PARAFAC y U-PLS en muestras reales

Muestra	Adición ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Predicción ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
		PARAFAC	U-PLS/RTL
M1-01	0	ND	ND
M1-02	150	186 (124)	120 (80)
M1-03	250	214 (86)	256 (102)
M2-01	0	62 ^a	40 ^a
M2-02	120	99 (83)	111 (93)
M2-03	150	146 (97)	139 (93)
M3-01	0	ND	ND
M3-02	200	233 (115)	202 (101)
M3-03	250	242 (97)	220 (88)
Recuperación promedio (%)		101	93

M1: manzana, M2: durazno, M3: pera

^a Detectable – no cuantificable

3.3.3.4. Cifras analíticas de mérito

Se calcularon las cifras analíticas de mérito para las muestras de validación y las muestras reales. En primer lugar, se compararon las cifras de mérito para los Modelos I y II, y para la calibración de orden 0, evaluándose la mejora aportada por el incremento en el orden de los datos. En la Tabla 3.11 se presentan las cifras de mérito obtenidas para una muestra de validación en solución acuosa. Para realizar el cálculo con datos de orden cero se obtuvieron las intensidades de fluorescencia máximas correspondientes de las EEMs obtenidas a los 6 minutos de iniciada la reacción de degradación ($\lambda_{\text{ex}}=240$ nm, $\lambda_{\text{em}}=390$ nm) y se construyó una curva de calibración univariada de acuerdo a los lineamientos de la IUPAC. Para los datos de segundo y tercer orden se emplearon los arreglos de datos correspondientes a los Modelos I y II descritos previamente. Las cifras de mérito mostraron una mejora notable al aumentarse el orden de los datos, obteniéndose valores de LOD cuatro veces menores en el modelado de tercer orden en comparación con los obtenidos para orden cero. La sensibilidad también mostró una mejora considerable, aunque es de destacar que el aumento de la sensibilidad no se tradujo en una disminución de los LOD y LOQ en la misma proporción. Si bien el LOD tiende a disminuir con el incremento de la sensibilidad, se estabiliza para mayores valores de sensibilidad debido a la contribución del término independiente de la sensibilidad en el cálculo del LOD. De esta manera,

aunque la sensibilidad continúe aumentando, el LOD no presentará variaciones significativas. En cuanto a la selectividad, se calcularon los valores para los Modelos I y II procesados con el algoritmo PARAFAC, ya que permite obtener los perfiles correspondientes a los componentes puros y, de esta manera, el cálculo de los valores de selectividad. Los valores de sensibilidad muestran un leve incremento al aumentar el orden de los datos, apoyando la hipótesis inicial del potencial aporte del modo cinético en el análisis de los datos.

Tabla 3.11. Cifras de mérito analíticas calculadas para las muestras de validación

Cifra de mérito	Orden cero	Segundo orden		Tercer orden	
		PARAFAC	U-PLS/RBL	PARAFAC	U-PLS/RTL
SEN (UL $\mu\text{g}^{-1}\text{ L}$)	14	33	10	110	32
SEL	-	0.42	-	0.56	-
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	16	5.2	5.0	4.1	3.6
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	48	16	15	12	11

Asimismo, se calcularon las cifras de mérito para las muestras reales, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Cifras analíticas de mérito calculadas para las muestras reales

Muestra	Cifra de mérito	PARAFAC	U-PLS
M1	SEN (UL $\mu\text{g}^{-1}\text{ L}$)	21	16
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	48	30
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	140	90
M2	SEN (UL $\mu\text{g}^{-1}\text{ L}$)	38	40
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	31	21
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	93	63
M3	SEN (UL $\mu\text{g}^{-1}\text{ L}$)	19	16
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	66	51
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	200	152

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones medidas fueron mayores en comparación con las empleadas en solución acuosa, como consecuencia del efecto matriz. Por tal motivo, los LOD y LOQ resultaron mayores en las 3 muestras analizadas. Se obtuvieron LODs de entre 21 y 66 $\mu\text{g L}^{-1}$, adecuados para la aplicación del método al considerar los límites establecidos por SENASA en Argentina.

3.3.4. Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un método para la cuantificación de residuos de AZM en muestras de frutas basado en la generación y modelado de datos de tercer orden. El dispositivo de mediana complejidad empleado para la generación de los datos, compuesto por un espectrofotómetro de fluorescencia y una fuente lumínica acoplados a una fibra óptica, permitió obtener un método simple y rápido para el análisis de residuo de AZM en muestras de frutas, con buen desempeño analítico. En particular, se logró disminuir el grado de complejidad de la determinación en comparación con los métodos usualmente empleados para este tipo de análisis, basados principalmente en técnicas separativas de cromatografía líquida o gaseosa que requieren instrumentos costosos.

Por otro lado, se favoreció la automatización del sistema mediante el empleo de una fibra óptica que permitió irradiar *in situ* la muestra en el interior de la cubeta. De esta manera, se evitó extraer la cubeta en cada ciclo de irradiación, lo que no solo aumentaría el tiempo de análisis sino que dificultaría el correcto control de los intervalos de tiempo entre mediciones, de elevada importancia en el análisis cinético. Dicho análisis se vio favorecido, además, por el uso de un espectrofotómetro de fluorescencia de barrido rápido que permitió registrar la EEM en unos pocos segundos, resultando despreciable el avance de la reacción durante la medición. De esta manera, se logró reducir el tiempo de análisis y el error asociado a tiempos prolongados de registro de los datos en simultáneo con la reacción de degradación.

La implementación del método desarrollado permitió obtener resultados satisfactorios en cuanto a predicción de concentraciones de AZM en muestras incógnitas, tanto artificiales como reales, y en cuanto a cifras de mérito analíticas. Se alcanzaron límites de detección y cuantificación acordes a los necesarios para el análisis de las muestras estrictamente reguladas por organismos de control, teniendo en cuenta los límites máximos permitidos.

Adicionalmente, se llevó a cabo la evaluación y comparación de resultados para diferentes tipos de datos. Para ello, se obtuvieron las predicciones de concentración de AZM en muestras de validación mediante calibración multivariada de segundo y tercer orden. Además, se estimaron las cifras de mérito para dichos modelos, comparándolos también con los valores calculados mediante calibración univariada. Se pudo demostrar la mejora del desempeño analítico al incrementar la complejidad del dato, obteniéndose mayor sensibilidad y selectividad y disminuyéndose los límites de detección y cuantificación. Estos resultados permiten realizar un aporte de relevancia al estudio de los diferentes tipos de datos instrumentales y su posterior modelado quimiométrico con algoritmos adecuados.

3.4. Análisis de residuos de pesticidas en frutas mediante modelado de datos de cuatro vías: cromatografía líquida de alto rendimiento y detección de fluorescencia

3.4.1. Consideraciones generales

La cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a detección de fluorescencia de barrido rápido permite generar datos de segundo orden tiempo-emisión.^{120,121} Como se explicó previamente, el correcto modelado de este tipo de datos permite no solo resolver matemáticamente picos cromatográficos solapados sino también analizar muestras que presentan compuestos interferentes. Asimismo, los sistemas cromatográficos pueden dar lugar a la generación de datos de tercer orden si son acoplados a detectores apropiados para tal fin.¹²⁰ Un ejemplo de este tipo de sistemas es la cromatografía bidimensional acoplada a detección mediante espectrometría de masas (GC×GC-MS).¹²² Otra forma de obtener datos de tercer orden con sistemas cromatográficos es mediante la obtención de EEMs en función del tiempo de elución. Se informaron en la literatura tres estrategias que se implementaron para generar este tipo de dato. En una de ellas, se llevó a cabo la inyección múltiple de una muestra en el sistema cromatográfico, registrándose los espectros de emisión de fluorescencia en función del tiempo de elución, cambiando la longitud de onda de excitación para cada una de las inyecciones.¹²³ Otra de las estrategias publicadas consistió en la recolección de fracciones en pocillos de placas de ELISA a la salida del procedimiento cromatográfico, a intervalos de no más de 2 s, registrándose posteriormente las EEMs de cada una de las fracciones.^{124,125} Por último, en un tercer enfoque se propuso el acoplamiento del instrumento cromatográfico a un espectrofotómetro de fluorescencia

de barrido rápido, conectando el capilar de salida de la columna de separación a una celda de flujo ubicada en el porta-cubetas del espectrofotómetro.^{126,127,128}

El correcto modelado de los datos generados es esencial para lograr extraer mayor información de calidad y representativa del caso real de estudio. Para ello, se han aplicado diferentes algoritmos de segundo y tercer orden. MCR-ALS resulta adecuado cuando se detecta pérdida de multilinealidad en uno de los modos, debido, por ejemplo, a corrimientos de los tiempos de elución cromatográficos de muestra a muestra.³⁰ Por otro lado, el algoritmo estructurado en variables latentes U-PLS puede ser implementado para el modelado de datos de tercer orden, acoplado a RTL para lograr la ventaja de segundo orden.^{129,130} En caso de que se compruebe la multilinealidad de los datos, el algoritmo PARAFAC puede ser elegido para el modelado.²⁶ Finalmente, Bortolato et al. propusieron una versión de PARAFAC aumentada (APARAFAC) para el modelado de datos de tercer orden con pérdida de multilinealidad en uno de los modos.¹³¹

La presencia de compuestos potencialmente perjudiciales para la salud humana y animal, como lo son los plaguicidas, es una problemática actual que requiere de medidas de control y regulación.¹³² Entre la variedad de métodos analíticos que se emplean para el análisis de residuos de plaguicidas, en particular de los grupos de los benzimidazólicos (carbendazín, tiabendazol y fuberidazol) y los carbamatos (carbofurán, carbaril y 1-naftol), se pueden mencionar la espectroscopia de fluorescencia,^{133,134,135} la cromatografía líquida acoplada a detector de arreglo de diodos,¹³⁶ de fluorescencia^{137,138} y de espectrometría de masas,¹³⁹ la cromatografía de gases acoplada a detección de espectrometría de masas,^{140,141} la cromatografía electrocinética micelar¹⁴² y métodos electroquímicos.¹⁴³

En este trabajo se plantea la cuantificación de residuos de carbendazín, tiabendazol, fuberidazol, carbofurán, carbaril y 1-naftol en muestras de manzana, pera y ciruela, mediante generación y modelado de datos de tercer orden. La generación de los datos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia de barrido rápido, realizando múltiples inyecciones por muestra, a diferentes longitudes de onda de excitación, y registrando las matrices de tiempo-emisión. Se evaluaron las ventajas aportadas por el análisis de este tipo de datos, y se compararon los resultados obtenidos mediante modelado de segundo y tercer orden. El método desarrollado se aplicó al análisis de muestras reales de frutas.

3.4.2. *Materiales y métodos*

3.4.2.1. Estándares, reactivos y muestras

Todos los estándares empleados corresponden a grado analítico. Las sustancias patrones de carbendazim (CBZ), FBZ, TBZ, carbofuran (CBF), carbaril (CBR) y naftol (NFT) se adquirieron en Sigma Aldrich (Estados Unidos). Los solventes MeOH grado LC y ACN grado LC, en Merck (Alemania) y DCM en Cicarelli (Argentina). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q[®] de Millipore (Estados Unidos).

Las muestras de manzana, pera y ciruela se adquirieron en mercados locales de la ciudad de Santa Fe, Argentina.

3.4.2.2. Instrumentación

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un instrumento Agilent 1100 LC (Agilent Technologies, Alemania), equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, inyector automático, horno de columna, detector de arreglo de diodos y detector de fluorescencia de barrido rápido.

Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 55 (Estados Unidos), equipado con una lámpara de descarga de xenón, empleando una cubeta de cuarzo de 1.00 cm de paso óptico. Las aperturas de rendija de excitación y emisión se establecieron en 5 nm y el voltaje del fotomultiplicador en 650 V.

3.4.2.3. Muestras de calibración, validación y reales

Las soluciones estándares concentradas de CBZ (300.0 mg L⁻¹), TBZ (700.0 mg L⁻¹), FBZ (300.0 mg L⁻¹), CBF (510.0 mg L⁻¹), CBR (600.0 mg L⁻¹) y NFT (580.0 mg L⁻¹) se prepararon disolviendo una masa pesada de cada sustancia en MeOH y se almacenaron en heladera a 4°C protegidas de la luz. Las soluciones estándares de trabajo se prepararon diariamente por dilución de las soluciones madres en agua ultrapura.

Para el diseño de las mezclas de calibración se dividió el cromatograma completo en dos regiones, la primera (RI) conteniendo a los analitos CBZ, TBZ and FBZ y la segunda (RII) a CBF, CBR y NFT. Se construyó un diseño central compuesto para cada una de las regiones, considerando los analitos incluidos en cada una de ellas, y luego se

combinaron obteniéndose un total de 15 muestras de calibración con 6 analitos en el rango de 10.0–400.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBZ, 2.0–80.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBZ, 0.1–1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para FBZ, 50.0–500.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBF, 2.0–80.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBR y 5.0–200.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para NFT.

Para el diseño de las mezclas de validación se siguió el mismo esquema empleado para la calibración, generándose una total de 13 mezclas de 6 analitos cuyas concentraciones se obtuvieron a partir de dos diseños combinados Box-Behnken (ver Tabla 3.13 y Tabla 3.14).

Las muestras de frutas se procesaron utilizando una licuadora de alimentos antes del procedimiento de extracción, obteniéndose un jugo compuesto por la fruta completa. Las muestras fortificadas se prepararon por dilución de la solución estándar concentrada de cada analito en jugo de fruta. En el primer paso, se centrifugaron las muestras adicionadas durante 10 minutos a 5000 rpm para lograr la eliminación de partículas en suspensión que podrían interferir en el proceso de extracción. Los pesticidas se recuperaron del sobrenadante mediante extracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Para ello, se transfirió 1.0 mL de sobrenadante de jugo a un tubo Eppendorf de 2.0 mL, se agregaron 100 μL de ACN, como solvente dispersivo, y 400 μL de DM, como solvente de extracción. Posteriormente, se agitaron las mezclas vigorosamente por 1 minuto empleando un agitador vortex, lográndose la formación de una dispersión de microgotas de DM y permitiendo el mayor contacto del solvente de extracción con la muestra para alcanzar altos niveles de extracción. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 14000 rpm para lograr la separación de fases. La fase inferior (DM) se extrajo empleando una jeringa y se transfirió a un tubo de vidrio para proceder a la evaporación del DM empleando un flujo de nitrógeno. El residuo final seco se disolvió en 1.0 mL de agua, agitando con vortex durante 1 min para lograr la completa disolución. Finalmente, las muestras se transfirieron a viales de HPLC de 2 mL para el análisis.

3.4.2.4. Procedimiento cromatográfico

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 75 mm \times 4.6 mm, de tamaño de partícula de 3.5 μm (Agilent Technology, Alemania). La fase móvil consistió en una mezcla de ACN y agua, en una relación 45:55 v/v, en modo isocrático. El flujo de la fase móvil se mantuvo constante en 0.8 mL min^{-1} . La temperatura del horno de columna se mantuvo en 30°C. Las muestras se filtraron antes de la inyección, usando un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm .

3.4.2.5. Generación de los datos

El instrumento cromatográfico empleado en el presente trabajo permite registrar datos de orden cero y de primer y segundo orden. En particular, los detectores con los que cuenta el instrumento permiten obtener espectros de absorción (DAD) y espectros de excitación o emisión de fluorescencia (FLD), registrados a cada tiempo de elución. En principio, el tipo de dato generado corresponde a un dato de segundo orden, con un modo temporal y un modo espectral (tiempo-absorción / tiempo-excitación / tiempo-emisión). El objetivo planteado requiere de la obtención de un modo espectral adicional para la generación y modelado de datos de tercer orden. Para ello, se aplicó una estrategia previamente desarrollada y descrita por Lozano et al.,¹²³ en la que se empleó un instrumento similar y a partir de la cual fue posible aumentar el orden de los datos. El procedimiento consiste en la múltiple inyección de muestras en el sistema cromatográfico, registrando para cada una de ellas las matrices tiempo-emisión y variando en cada una de las inyecciones la longitud de onda de excitación. En el presente caso, cada muestra analizada, ya sea de calibración, validación o real, se inyectó 7 veces en el sistema cromatográfico, obteniéndose una matriz de tiempo-emisión al finalizar cada separación cromatográfica, con espectros de emisión de fluorescencia correspondientes a las siguientes longitudes de onda de excitación: 278, 283, 286, 290, 293, 296 y 305 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron en un rango espectral de entre 305 y 500 nm, cada 1 nm. Las 7 matrices obtenidas permitieron obtener un cubo de datos por cada muestra, de dimensiones 549×191×7.

3.4.2.6. Pre-procesamiento de los datos

Antes del modelado de los datos obtenidos, se llevó a cabo una serie de pasos de preprocesamiento de la señal que permitió mejorar el modelo y los resultados finales. En primer lugar, se aplicó un suavizado en la dirección del modo temporal para reducir las variaciones debido al ruido instrumental, empleando el método de Savitzky-Golay.⁶⁷ Las variaciones de la línea de base se corrigieron mediante la sustracción de la señal del blanco, considerando como señal del blanco el espectro registrado en la región del cromatograma correspondiente al volumen muerto de la columna, asegurando la ausencia de señal atribuida a los analitos de interés. En la Figura 3.25 se muestra una

matriz tiempo-emisión obtenida para una mezcla de calibración, en donde se observan con claridad las diferencias en la línea de base en el rango espectral de emisión registrado y se muestra, además, la señal del blanco que fue sustraída de la matriz de datos, en cada punto del modo temporal.

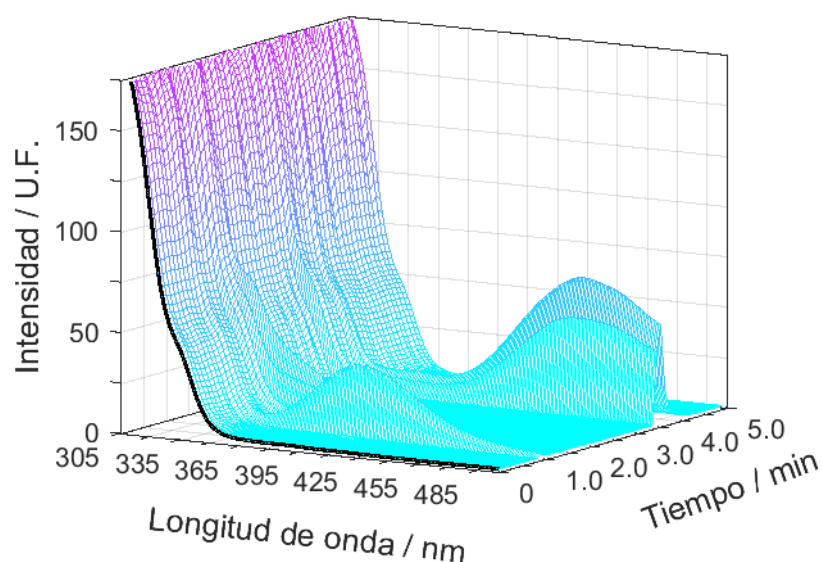


Figura 3.25. Matriz tiempo-emisión registrada para una mezcla de calibración. En línea continua negra se muestra la señal blanco sustraída de la matriz de datos para la corrección de la línea de base.

3.4.2.7. Programas informáticos

Para el control del instrumento cromatográfico y la recolección de datos se empleó el programa informático ChemStation (Agilent Technologies, Alemania). Todos los algoritmos usados se implementaron en MATLAB 7.6. Los algoritmos necesarios para el modelado con MCR-ALS se encuentran disponibles en la página web <http://www.mcrals.info/>. Además, se utilizaron la interfaces gráficas MVC2 y MVC3 para el modelado de segundo y tercer orden, respectivamente, disponibles en la página web www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/, desarrolladas por Olivieri et al.^{99,119}

3.4.3. Resultados

3.4.3.1. Análisis de los datos

En la Figura 3.26 se pueden observar los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de los pesticidas CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR y NFT, obtenidos de soluciones estándares de patrones puros en ACN, registrados en el espectrofluorímetro. El análisis de los espectros permite destacar la ventaja de usar la región espectral completa, tanto en excitación como en emisión, en lugar de longitudes de onda de compromiso. Por un lado, se busca un aumento en la selectividad del método, aprovechando la diferencia que presentan los espectros individuales y considerando la baja resolución cromatográfica lograda para algunos de los analitos (explicado en detalle a continuación). Por otro lado, la sensibilidad también se verá favorecida empleando las regiones espectrales completas, lo que puede evidenciarse principalmente en la región de emisión. Aquí, puede observarse que a las longitudes de onda correspondientes a los máximos de emisión de ciertos analitos, la intensidad de emisión de los restantes es significativamente menor.

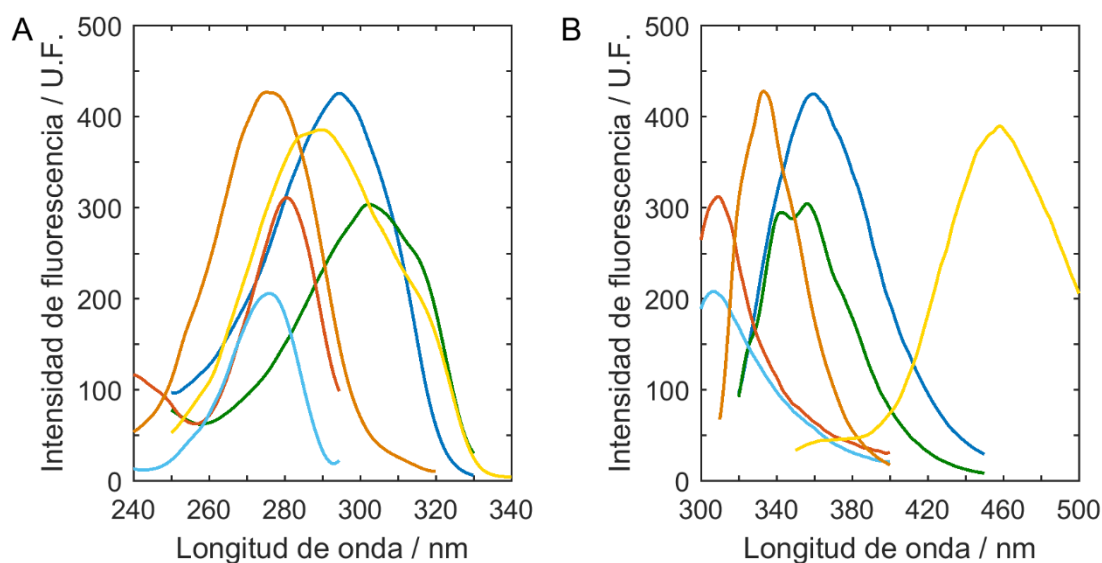


Figura 3.26. Espectros de excitación (A) y emisión (B) de fluorescencia de los analitos puros: rojo: CBZ, azul: TBZ, verde: FBZ, celeste: CBF, naranja: CBR, amarillo: NFT.

Adicionalmente, el análisis de los cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda de emisión, y una misma longitud de onda de excitación, permite reforzar la hipótesis del aumento en la sensibilidad del método cuando se emplea la información espectral completa. En la Figura 3.27 se presentan los cromatogramas registrados para

una mezcla de validación y un muestra de manzana fortificada, a una longitud de onda de excitación $\lambda_{ex}=283$ nm y a tres longitudes de onda de emisión diferentes, $\lambda_{em}=325$, 355 y 455 nm. Nuevamente, se evidencia que la selección de una longitud de onda de emisión de compromiso limitaría la determinación simultánea de los 6 analitos. Se puede observar en los cromatogramas que no se logra la resolución completa de los picos cromatográficos de los 6 pesticidas analizados, principalmente en la RI, y que, además, la muestra presenta compuestos interferentes cuyos picos cromatográficos se solapan con los correspondientes a los pesticidas. La selección de una longitud de onda que permita una menor contribución de los compuestos interferentes a la respuesta global repercute en una menor señal de los analitos de interés y, por consiguiente, en una menor sensibilidad del método.

De esta manera, se ponen en evidencia las potenciales ventajas aportadas por los datos generados a partir de la inyección múltiple de muestras, que dieron origen a las matrices de tiempo-emisión a diferentes longitudes de onda de excitación, para el sistema en estudio. A continuación, se abordará el análisis completo de datos de segundo y tercer orden, y la comparación de los resultados obtenidos, para demostrar de manera concluyente la validez de las hipótesis presentadas en esta sección, en relación al análisis previo de los datos.

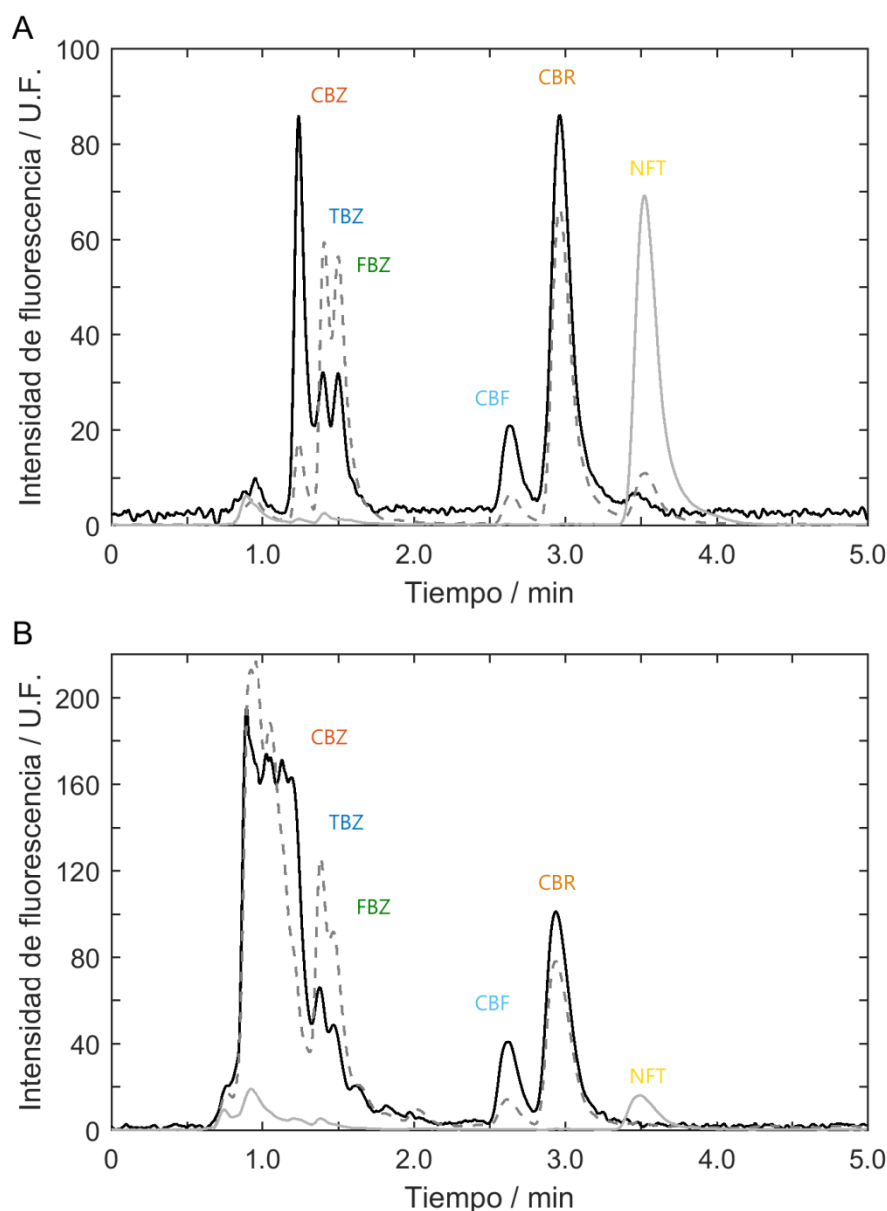


Figura 3.27. Cromatogramas registrados a $\lambda_{\text{ex}}=283$ nm y $\lambda_{\text{em}}=325$ nm (línea continua negra), 355 nm (línea punteada gris) y 455 nm (línea continua gris) para una muestra de validación (A) y una muestra real adicionada con los 6 analitos (B).

3.4.3.1. Modelado de datos de segundo y tercer orden por MCR-ALS

El modelado quimiométrico de los datos por MCR-ALS se llevó a cabo para las regiones temporales, RI y RII, mencionadas previamente. Para ello, se emplearon la RI, que comprende los tiempos de elución entre 1.1 y 1.8 minutos, y la RII, entre 2.5 y 4.0 minutos, y se construyeron las dos matrices aumentadas \mathbf{D}_{aum} (Figura 3.28) descritas a continuación:

D_{aum1} – dato de segundo orden: se obtuvieron a partir de las matrices tiempo-emisión ($J \times K$) registradas a una longitud de onda de excitación $\lambda_{ex2} = 283$ nm. Los espectros de emisión se restringieron a las longitudes de onda comprendidas entre 310 y 430 nm para la RI, y 320 y 480 nm para la RII. Las matrices correspondientes a las 15 muestras de calibración y las de validación se concatenaron en el sentido del tiempo cromatográfico para obtener la matriz aumentada.

D_{aum2} – dato de tercer orden: en primer lugar, se concatenaron las 7 matrices tiempo-emisión, obteniéndose una matriz de tiempo-emisión-excitación ($J \times K \times L$) por muestra. Al igual que para los datos de segundo orden, los espectros de emisión se restringieron a las longitudes de onda comprendidas entre 310 y 430 nm para la RI, y 320 y 480 nm para la RII. Adicionalmente, se eliminó una longitud de onda de excitación, $\lambda_{ex7}=305$ nm, en el modelado de la RI y dos longitudes de onda, $\lambda_{ex6-7}=296-305$ nm, en el modelado de la RII. Por último, las matrices correspondientes a las muestras de calibración y las de validación se concatenaron en el sentido del tiempo cromatográfico para obtener la matriz aumentada.

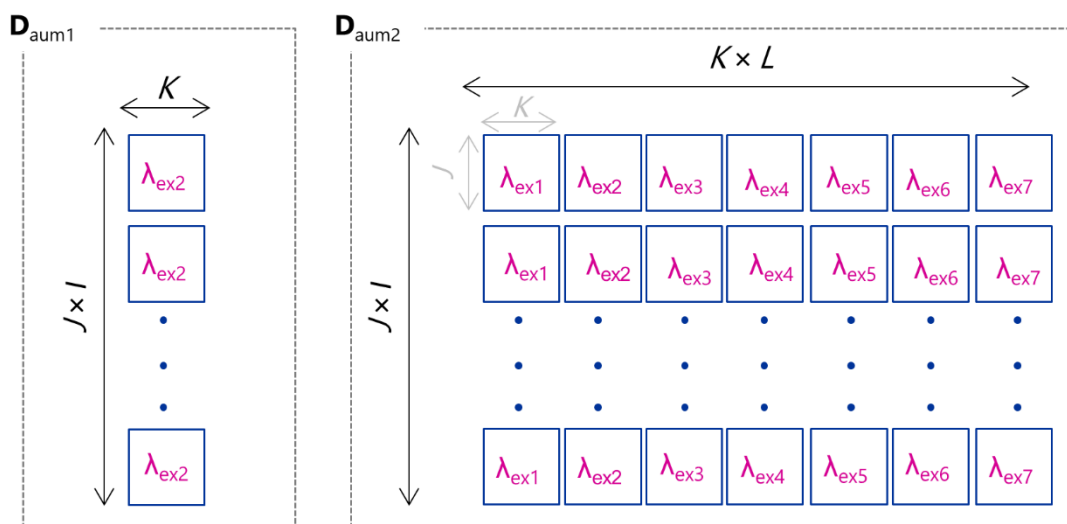


Figura 3.28. Arreglo de datos tiempo-emisión (D_{aum1}) y tiempo-emisión-excitación (D_{aum2}) para el modelado por MCR-ALS, para datos de segundo y tercer orden, respectivamente.

Para generar las estimaciones iniciales se emplearon los espectros de fluorescencia puros obtenidos previamente (Figura 3.26), y 3 componentes para cada una de las regiones modeladas. Durante la optimización por ALS, se aplicaron las restricciones de

no-negatividad tanto en el modo temporal como espectral, y unimodalidad mediante corte vertical en el modo temporal para eliminar picos dobles. Se obtuvieron las matrices **C** y **S**, conteniendo la información de los perfiles cromatográficos y espectrales puros de cada componente, respectivamente, para cada una de las muestras. En la Figura 3.29 se muestran los perfiles obtenidos por MCR-ALS de la descomposición de la matriz **D** generada con los datos de tercer orden. Los resultados obtenidos corresponden a los perfiles cromatográficos y espectrales de excitación y emisión para los componentes de las RI y II.

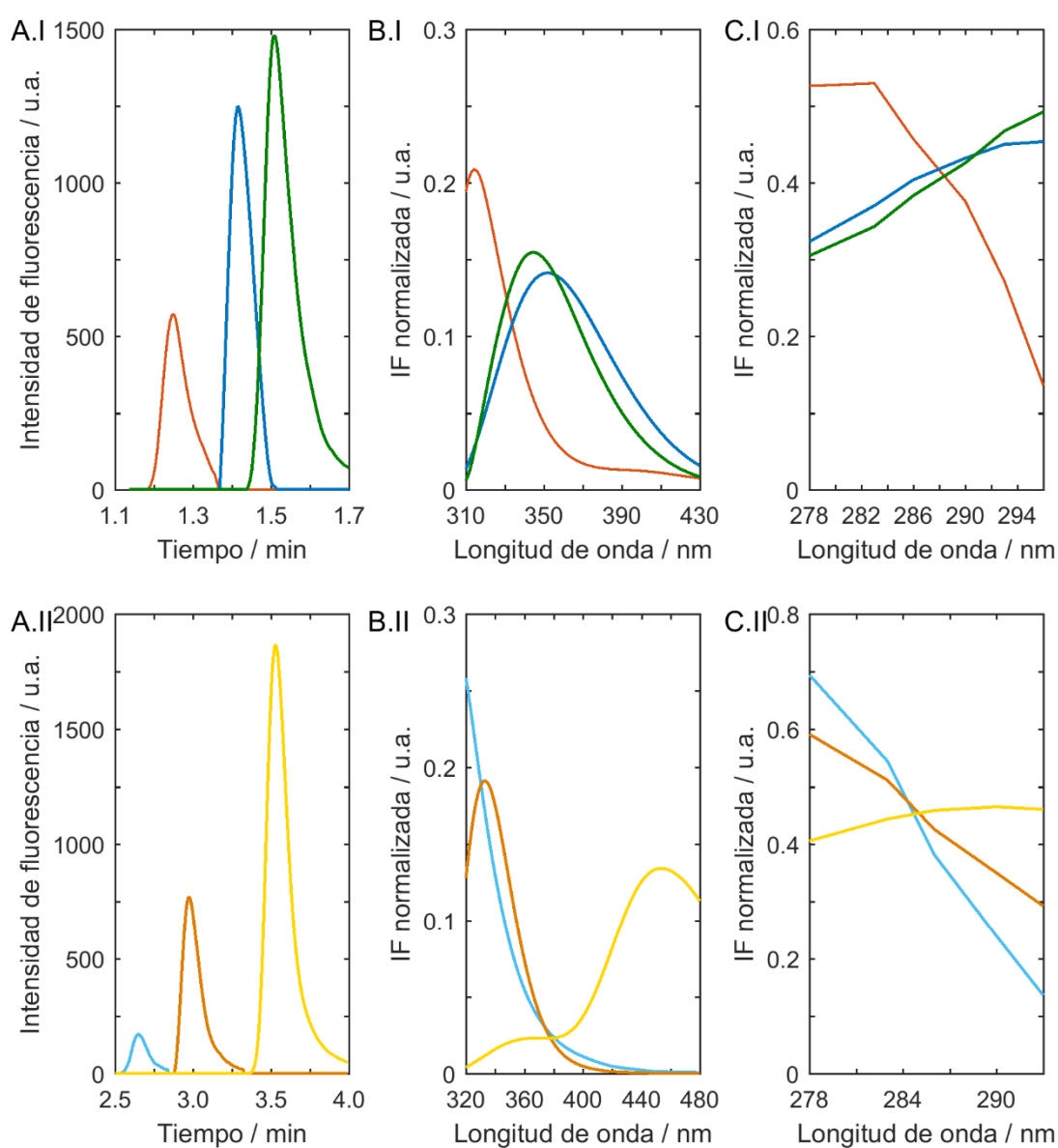


Figura 3.29. Perfiles obtenidos por MCR-ALS de tiempo (A.I y A.II para RI y RII, respectivamente) y espectrales de emisión (B.I y B.II para RI y RII, respectivamente) y excitación (C.I y C.II para RI y RII, respectivamente): rojo: CBZ, azul: TBZ, verde: FBZ, celeste: CBF, naranja: CBR, amarillo: NFT.

A continuación, se obtuvieron las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los perfiles puros obtenidos por MCR-ALS y se utilizaron para construir las curvas de calibración pseudo-univariadas, a partir de las áreas de cada componente en cada muestra en función de sus concentraciones nominales. Las curvas de calibración obtenidas se emplearon para predecir la concentración de los analitos en las muestras de validación y estimar las cifras de mérito analíticas, evaluando así el desempeño del método mediante modelado de los datos por MCR-ALS. En la Tabla 3.13 y la Tabla 3.14 se muestran los resultados de predicción obtenidos para los 6 analitos, para el modelado de segundo y tercer orden, respectivamente. Los valores de error de predicción relativos (REP) obtenidos fueron menores al 10 %, excepto para el FBZ que presentó un valor del 35 y 29 %, para el modelado de segundo y tercer orden, respectivamente.

3.4.3.2. Modelado de datos de segundo y tercer orden por U-PLS

Para el modelado por U-PLS el primer paso consiste en la vectorización de los datos, mediante el desdoblamiento de las matrices de datos obtenidas. Al igual que para el modelado por MCR-ALS, se evaluaron dos modelos para los datos de segundo y tercer orden. Para ello, se obtuvieron los siguientes arreglos de datos (Figura 3.30):

Modelo 1 – dato de segundo orden: a partir de las matrices tiempo-emisión ($J \times K$), registradas a una longitud de onda de excitación $\lambda_{\text{ex}2} = 283 \text{ nm}$, se obtuvieron los vectores para cada muestra de dimensiones $1 \times JK$. Para el modelado se seleccionaron las regiones temporales (RI y RII) y espectrales de emisión (RI: $\lambda_{\text{em}}=310\text{-}430 \text{ nm}$ y RII: $\lambda_{\text{em}}=320\text{-}480 \text{ nm}$) de la misma manera que se realizó previamente.

Modelo 2 – dato de tercer orden: en primer lugar, se concatenaron las 7 matrices tiempo-emisión, obteniéndose una matriz de tiempo-emisión-excitación ($J \times K \times I$) por muestra. En segundo lugar, se desdoblaron las matrices tiempo-emisión-excitación obteniéndose un vector de dimensiones $1 \times JKL$. Al igual que para los datos de segundo orden, se seleccionaron las regiones temporales (RI y RII), espectrales de emisión (RI: $310\text{-}430 \text{ nm}$ y RII: $320\text{-}480 \text{ nm}$) y espectrales de excitación (RI: $278\text{-}296 \text{ nm}$ y RII: $278\text{-}293 \text{ nm}$).

Para el correcto análisis por U-PLS es necesario, en primer lugar, seleccionar el número adecuado de variables latentes. Para ello, se empleó el método de validación

cruzada (*leave-one-sample-out cross-validation*), estableciendo el número de variables del sistema bajo estudio igual a 6, para el cual la probabilidad de que $F > 1$ es 75 %.

Se construyó un modelo de calibración para cada uno de los analitos, es decir, que en la construcción de cada modelo de calibración se consideraron las concentraciones individuales de cada analito, sin tener en cuenta la de los 5 restantes. Se obtuvieron los *loadings* y los *scores*, los que se emplearon en la predicción de las concentraciones en las muestras de interés. En este caso, los modelos se aplicaron a la predicción de las concentraciones de los 6 plaguicidas en las mezclas de validación, cuyos resultados se compararon con los obtenidos por MCR-ALS.

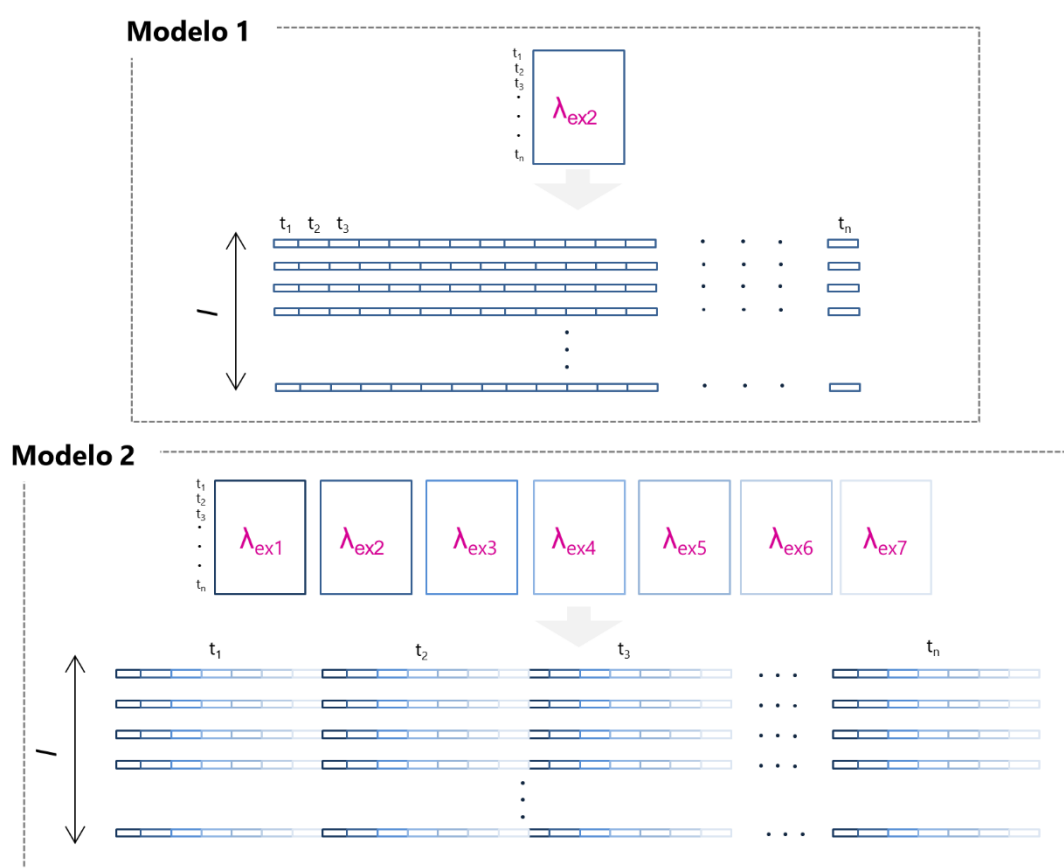


Figura 3.30. Vectorización de los datos de tiempo-emisión (Modelo 1) y tiempo-emisión-excitación (Modelo 2) para el modelado por U-PLS, para datos de segundo y tercer orden, respectivamente.

En las Tabla 3.13 y Tabla 3.14 se muestran los valores de predicción obtenidos por U-PLS, junto con los obtenidos por MCR-ALS, para el modelado de los datos de segundo y tercer orden, respectivamente.

Tabla 3.13. Resultados de predicción por MCR-ALS y U-PLS para datos de segundo orden en muestras de validación (MV)

Datos de orden 2		MV1	MV2	MV3	MV4	MV5	MV6	MV7	MV8	MV9	MV10	MV11	MV12	MV13	REP (%)
CBZ / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	175	300	300	175	50	50	175	50	175	300	300	175	50	
	Predicho MCR-ALS	163	324	329	183	21	33	168	39	170	331	299	174	33	9
	Predicho U-PLS	162	274	282	157	41	37	157	40	152	292	274	163	39	8
TBZ / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	35	10	35	10	60	35	60	35	10	35	60	60	10	
	Predicho MCR-ALS	35	11	33	9	60	38	57	34	9	34	64	61	7	5
	Predicho U-PLS	33	11	37	8	59	40	55	34	13	35	58	60	8	6
FBZ / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	0.7	0.7	1.1	0.3	0.7	1.1	0.3	0.3	1.1	0.3	0.7	1.1	0.7	
	Predicho MCR-ALS	0.8	0.5	1.2	0.03	0.6	0.7	0.1	0.1	0.6	0.2	0.6	1.1	0.3	35
	Predicho U-PLS	0.6	0.7	1.1	0.2	0.6	1.2	0.2	0.2	1.1	0.3	0.7	1.2	0.5	13
CBF / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	250	100	250	100	400	250	400	250	100	250	400	400	100	
	Predicho MCR-ALS	236	115	245	93	402	252	377	257	70	251	353	387	101	7
	Predicho U-PLS	221	99	259	76	375	272	358	223	116	246	386	398	68	8
CBR / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	35	60	60	35	10	10	35	10	35	60	60	35	10	
	Predicho MCR-ALS	33	57	59	32	10	9	34	9	32	61	57	35	9	5
	Predicho U-PLS	32	55	56	31	8	8	31	8	30	58	55	33	8	8
NFT / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	85	85	150	20	85	150	20	20	150	20	85	150	85	
	Predicho MCR-ALS	84	84	137	19	77	150	18	18	138	19	81	148	66	8
	Predicho U-PLS	74	85	136	18	80	161	22	20	144	26	82	149	68	8

Tabla 3.14. Resultados de predicción por MCR-ALS y U-PLS para datos de tercer orden en muestras de validación (MV)

Datos de orden 3		MV1	MV2	MV3	MV4	MV5	MV6	MV7	MV8	MV9	MV10	MV11	MV12	MV13	REP
															(%)
CBZ / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	175	300	300	175	50	50	175	50	175	300	300	175	50	
	Predicho MCR-ALS	159	301	318	177	46	34	177	44	172	322	307	180	35	6
	Predicho U-PLS	162	278	286	162	47	52	166	40	169	307	285	177	48	6
TBZ / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	35	10	35	10	60	35	60	35	10	35	60	60	10	
	Predicho MCR-ALS	35	10	35	8	58	37	54	34	11	34	62	64	8	5
	Predicho U-PLS	35	10	37	11	58	36	55	36	11	35	58	61	7	5
FBZ / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	0.7	0.7	1.1	0.3	0.7	1.1	0.3	0.3	1.1	0.3	0.7	1.1	0.7	
	Predicho MCR-ALS	0.8	0.6	1.0	0.1	0.6	0.8	0.1	0.1	0.6	0.1	0.6	0.9	0.4	29
	Predicho U-PLS	0.7	0.7	1.1	0.2	0.6	1.2	0.2	0.2	1.0	0.2	0.7	1.1	0.5	11
CBF / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	250	100	250	100	400	250	400	250	100	250	400	400	100	
	Predicho MCR-ALS	215	110	252	108	356	230	385	241	89	248	383	407	118	7
	Predicho U-PLS	245	101	270	92	368	245	252	239	95	228	384	392	55	8
CBR / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	35	60	60	35	10	10	35	10	35	60	60	35	10	
	Predicho MCR-ALS	34	56	58	32	9	10	35	9	32	60	57	37	9	5
	Predicho U-PLS	32	56	57	33	9	10	33	8	34	61	57	35	10	5
NFT / $\mu\text{g L}^{-1}$	Nominal	85	85	150	20	85	150	20	20	150	20	85	150	85	
	Predicho MCR-ALS	83	84	137	19	77	150	18	18	138	20	81	148	66	8
	Predicho U-PLS	83	86	140	24	78	151	19	22	135	21	79	143	65	8

Los valores de REP obtenidos para 5 de los 6 analitos (CBZ, TBZ, CBF, CBR y NFT) fueron similares a los obtenidos por MCR-ALS, previamente discutidos. Sin embargo, los valores de predicción para FBZ, y el correspondiente REP, mejoran notablemente cuando se aplica U-PLS, con resultados de REP iguales a 13 y 11 %, para segundo y tercer orden, respectivamente. La mejora significativa en la predicción de FBZ puede atribuirse a la alta sensibilidad alcanzada por U-PLS, con límites de detección 10 veces menores que los alcanzados por MCR-ALS (Tabla 3.16). Por otro lado, el algoritmo PLS presenta buen desempeño en el modelado de sistemas altamente colineales, lo que se puede atribuir a la estructura en variables latentes.

3.4.3.3. Análisis de muestras reales

Se llevó a cabo el análisis de muestras de tres frutas adicionadas con la mezcla de los seis plaguicidas sometidas al procedimiento de extracción, cuantificándose los niveles de CBZ, TBZ, FBZ, CBF, CBR y NFT. Además, se analizaron muestras sin adición de los analitos para evaluar la presencia de residuos de los plaguicidas calibrados en las frutas adquiridas en los comercios. Para esta etapa se aplicó el modelado con U-PLS, considerando que fue el algoritmo que mostró el mejor desempeño en la predicción de la concentración de los analitos en las muestras de validación para el sistema en estudio.

Por otro lado, el estudio previo de la respuesta obtenida del análisis de muestras reales permitió evidenciar la presencia de efecto matriz producto de los componentes inherentes de la matriz de las frutas. Por ello, el estudio de predicción y recuperación en muestras reales se llevó a cabo aplicando el método de adición estándar, que consistió en la adición de los seis analitos en tres niveles de concentración a una muestra adicionada y sin adición de los analitos de interés. Es decir, cada muestra se dividió en dos partes, una parte fortificada con solución estándar combinada de los seis analitos y una parte sin fortificar. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.15.

Los valores de recuperación más cercanos al 100 % se obtuvieron para los pesticidas CBF y CBR, con recuperaciones en el rango de 85-113 %. Los pesticidas correspondientes a la RI presentaron valores de recuperación aceptables en las muestras 1 y 2 (70 - 97 %), siendo menores en el caso de la muestra 3. Por otro lado, el tercer analito correspondiente a la RII, NFT, no pudo ser determinado al ser el componente mayormente afectado por el efecto matriz.

Por otro lado, es de destacar la presencia de los pesticidas CBZ y TBZ en las tres muestras analizadas, y de FBZ en la M3 (ciruela). No obstante, las concentraciones detectadas se encuentran en muy bajo nivel y no superan los límites establecidos por los organismos de control.

Tabla 3.15. Resultados de predicción por U-PLS en muestras reales

		M1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)		M2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)		M3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
CBZ	Adición	0	30	0	150	0	150
	Predicción	26	55 (97)	36	146 (73)	13	83 (48)
TBZ	Adición	0	10	0	40	0	40
	Predicción	5.0	13.4 (84)	ND	39 (97)	3.9	24 (51)
FBZ	Adición	0	0.3	0	0.8	0	0.8
	Predicción	ND	0.21 (70)	ND	0.78 (97)	0.1	0.6 (63)
CBF	Adición	0	100	0	250	0	250
	Predicción	ND	81 (81)	ND	211 (85)	ND	263 (105)
CBR	Adición	0	10	0	40	0	40
	Predicción	ND	10 (100)	ND	34 (88)	ND	43 (107)
NFT	Adición	0	10	0	95	0	95
	Predicción	ND	11 (110)	NR	NR	NR	NR

M1: manzana, M2: pera, M3: ciruela

NR: no resuelto

Recuperación (%) entre paréntesis

3.4.3.4. Cifras de mérito analíticas

Se calcularon las cifras de mérito analíticas para comparar nuevamente el desempeño de cada uno de los algoritmos empleados, por un lado, y para evaluar la aplicabilidad del método para el fin propuesto, por el otro. Una de las cifras de mérito de especial relevancia es la sensibilidad, debido a su importante influencia en la estimación de otras cifras de mérito como los LOD y LOQ. Estos límites juegan un rol clave en la utilidad del método desarrollado para la aplicación en la situación de interés. En el presente caso, los límites deben garantizar la determinación de los

pesticidas en muestras de frutas en concentraciones tan bajas como los límites establecidos por los organismos de control.

En la Tabla 3.16 se muestran los resultados obtenidos de cifras de mérito, tanto para las muestras de validación como para las muestras reales. Las cifras de mérito se calcularon tanto para los datos de segundo orden como para los de tercer orden, de manera de evaluar mejoras y contribuir al estudio de las ventajas aportadas por los datos de orden superior.

En todos los casos, tanto en relación con los analitos como con los algoritmos, se evidenció un aumento en la sensibilidad al pasar de orden dos a orden tres. Es de destacar que este aumento no siempre se ve reflejado en una reducción proporcional de los límites de detección y cuantificación. Si bien se encuentra reportado en la bibliografía el aumento de la SEN y la disminución de los límites de detección y cuantificación cuando se aumenta el orden de los datos, hay evidencia que indica que en la medida en que se incrementa la complejidad del dato, la disminución de los límites se estabiliza aun cuando la SEN sigue en aumento.²⁵

Por otro lado, se realizó una comparación de los resultados obtenidos con aquellos informados en trabajos publicados. Se observó una mejora en la sensibilidad y en los LOD y LOQ para algunos de los pesticidas. Dependiendo del método empleado para la detección, las cifras de mérito encontradas varían. Por ejemplo, se reportan LODs comprendidos entre 0.6 y 65 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBZ, 0.02 y 0.30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para FBZ, 0.3 y 4.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TBZ, 0.13 y 4.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBF, 0.8 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBR, y 2 y 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ para NFT. Este análisis permite arribar a la conclusión de que el desempeño del método propuesto en cuanto a cifras de mérito resulta satisfactorio y, en algunos casos, supera a los obtenidos por otros métodos.^{133,135,136,137,140,143}

Tabla 3.16. Cifras de mérito analíticas obtenidas para muestras de validación y calibración, en el modelado por MCR-ALS y U-PLS (2° orden/3° orden).

	CBZ		TBZ		FBZ	
	MCR-ALS	U-PLS	MCR-ALS	U-PLS	MCR-ALS	U-PLS
Muestras validación						
SEN	2 /3	8 /20	10 /25	30 /89	220 /710	1300 /3900
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	24 /32	4.7 /2.1	4.4 /8.7	1.2 /0.6	0.4/0.4	0.04 /0.02
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	72/96	14/6.3	13/26	3.6/1.8	1.2/.12	0.12/0.06
Muestras reales						
SEN	–	10	–	34	–	1380
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	–	30	–	7.0	–	0.07
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	–	90	–	21	–	0.21
	CBF		CBR		NFT	
	MCR-ALS	U-PLS	MCR-ALS	U-PLS	MCR-ALS	U-PLS
Muestras validación						
SEN	0.5 /0.6	5 /13	14 /18	38 /100	9 /20	12 /34
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100 /110	12.2 /4.6	2.4 /2.8	0.9 /0.4	12 /12	4.9 /2.4
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	300/330	36.6/13.8	7.2/8.4	2.7/1.2	36/36	14.7/7.2
Muestras reales						
SEN	–	6	–	41	–	11
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	–	20	–	3.1	–	7.3
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	–	60	–	9.3	–	22

3.4.4. Conclusiones

La obtención y el correcto modelado de datos de cuatro vías, generados mediante HPLC-FLD a partir de matrices de tiempo-emisión registradas a diferentes longitudes de onda de excitación, se presenta como una alternativa que permite mejorar el desempeño analítico de un método para análisis de muestras complejas.

La comparación de diferentes tipos de datos y diferentes algoritmos para el modelado de segundo y tercer orden permitió realizar un análisis profundo de las ventajas aportadas al analizar datos complejos, y entender la importancia de seleccionar el algoritmo más adecuado para el procesamiento de los datos obtenidos. No sólo se logra aumentar la exactitud del método, mejorándose los valores de concentración predichos por los modelos construidos, sino también se alcanzan mejoras en las cifras de mérito, de especial relevancia en métodos aplicados al análisis de muestras bajo estricto control y regulación.

En este capítulo, se describió el análisis de datos por MCR-ALS y U-PLS a través de la comparación del desempeño en la predicción de concentraciones y estimación de cifras de mérito en mezclas de validación y muestras reales. El algoritmo U-PLS logró los mejores resultados debido al mejor manejo del alto grado de colinealidad en uno de los modos, gracias a su estructura en variables latentes.

Los resultados de predicción obtenidos para las mezclas de validación fueron aceptables, con una mejoría al pasar de segundo a tercer orden. Por otro lado, se lograron mejoras notables en las cifras de mérito analíticas al aumentar el orden de los datos, alcanzándose valores de límites de detección y cuantificación acordes a los LMRs actualmente establecidos para los plaguicidas en cuestión.

Adicionalmente, se analizaron con éxito 3 muestras reales, de manzana, pera y ciruela, empleando la estrategia desarrollada y modelando los datos con el algoritmo U-PLS, obteniéndose altos niveles de recuperación. La implementación del método de adición estándar, en el que los componentes de la matriz se encuentran contemplados en la etapa de calibración, permitió aplicar directamente los modelos construidos sin necesidad de un paso adicional de RBL o RTL para modelar interferencias.

Considerando lo anteriormente expuesto, la estrategia se presenta como una alternativa de gran potencial para el análisis de residuos de plaguicidas presentes en muy bajas concentraciones en muestras de frutas. La relevancia de poder detectar estas sustancias tóxicas en niveles de traza radica en los efectos perjudiciales que tienen sobre la salud humana y animal. El continuo estudio de las enfermedades asociadas a la exposición de plaguicidas permite el avance y la actualización de las normas de

regulación y los niveles máximos permitidos, lo que debe verse acompañado del desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan detectar y cuantificar concentraciones cada vez menores de los analitos de interés.

Conclusiones generales

4. CONCLUSIONES GENERALES

El análisis global de la evaluación de una variedad de sistemas permite afirmar que existen múltiples factores que deben tenerse en cuenta cuando se busca desarrollar métodos para el análisis de compuestos presentes en muy bajas concentraciones en muestras de composición compleja. No sólo se deben evaluar las técnicas analíticas disponibles para poder seleccionar la más apropiada para el fin propuesto, sino también los tipos de datos que se pueden generar y los algoritmos adecuados para modelarlos, la respuesta del analito de interés cuando se encuentra inmerso en la matriz de la muestra real, que puede contener compuestos no esperados, y la aplicabilidad del método frente a la situación para la que se lo desarrolla.

La aplicación de técnicas separativas y espectroscópicas permite generar diferentes tipos de datos y desarrollar métodos analíticos altamente sensibles para la cuantificación de analitos en bajas concentraciones presentes en diversos productos alimenticios. La calibración multivariada contribuye en la determinación de analitos en sistemas de multicomponentes explotando las ventajas aportadas según el tipo de dato instrumental obtenido. A través del modelado por PLS de los datos de primer orden generados para la determinación de proteínas en leche bovina es posible analizar muestras de leche sin pretratamientos adicionales, es decir evitando etapas de extracción, y cuantificar simultáneamente tres proteínas y el contenido proteico total. Por otro lado, los datos de segundo y tercer orden, generados para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas y cereales, modelados con U-PLS, PARAFAC y MCR-ALS, posibilitan a la cuantificación de analitos en presencia de compuestos no esperados, mostrando una marcada mejora en las cifras de mérito analíticas.

En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que el análisis de muestras complejas es posible gracias al uso de estrategias analíticas experimentales combinadas con herramientas quimiométricas de pretratamiento de datos y posterior modelado. Estos resultados ponen en evidencia la capacidad de técnicas de mediana o baja complejidad para brindar resultados confiables a través de métodos simples y rápidos. Cuando la selección del instrumento que registra la señal correspondiente a los analitos de interés se lleva a cabo teniendo en cuenta los tipos de datos que generan y los algoritmos disponibles para modelarlos, se logran plantear estrategias que se adaptan a la problemática particular del sistema estudiado. En este trabajo, se

observó que la presencia de componentes diferentes a los analitos de interés en las muestras analizadas da lugar a una variedad de efectos que deben ser resueltos aplicando distintas estrategias de resolución. La presencia de interferentes se puede resolver con la ventaja de segundo orden usando instrumentos que generen arreglos matriciales o tridimensionales modelados con algoritmos como MCR-ALS, U-PLS/RML y PARAFAC. Además, se pueden proponer otras formas de hacer frente a los efectos de las interferencias que no pueden ser simplemente resueltas mediante calibración multivaria. Se pudo comprobar que en presencia de efecto matriz, se puede aplicar con éxito la adición estándar y la estandarización de la señal mediante PDS para determinar la concentración de los analitos calibrados. Por otro lado, la calibración multivariada de primer orden empleando el algoritmo PLS estructurado en variables latentes resulta útil para modelar el efecto de determinados componentes de la matriz de la muestra sobre la señal global obtenida, siendo necesario para ello un minucioso diseño de mezclas de calibración en presencia de la matriz de muestra.

Finalmente, resulta posible afirmar que la resolución de las situaciones particulares mencionadas visibiliza el amplio abanico de posibilidades que ofrecen las herramientas analíticas y quimiométricas disponibles para desarrollar métodos de análisis alternativos que no sólo brinden resultados similares a los métodos de referencia sino que aporten ventajas adicionales que contribuyan a hacer frente a los desafíos que se presentan en el control de calidad de productos alimenticios.

Referencias

5. REFERENCIAS

1. Nielsen, S. S., *Food Analysis*. Springer: Purdue University West Lafayette, IN, USA, 2010.
2. Parson, W. W., *Modern Optical Spectroscopy: With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry*. Springer Berlin Heidelberg: 2016.
3. Steele, D., Infrared Spectroscopy: Theory. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*.
4. Perkins, W. D., Fourier transform infrared spectroscopy. Part III. Applications. *Journal of Chemical Education* **1987**, 64 (12), A296.
5. Siebert, F.; Hildebrandt, P., Instrumentation. In *Vibrational Spectroscopy in Life Science*, 2008
6. Alcaráz, M. R.; Schwaighofer, A.; Kristament, C.; Ramer, G.; Brandstetter, M.; Goicoechea, H.; Lendl, B., External-Cavity Quantum Cascade Laser Spectroscopy for Mid-IR Transmission Measurements of Proteins in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* **2015**, 87 (13), 6980-6987.
7. Alcaráz, M. R.; Schwaighofer, A.; Goicoechea, H.; Lendl, B., EC-QCL mid-IR transmission spectroscopy for monitoring dynamic changes of protein secondary structure in aqueous solution on the example of β -aggregation in alcohol-denaturated α -chymotrypsin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, 408 (15), 3933-3941.
8. Brandstetter, M.; Genner, A.; Anic, K.; Lendl, B., Tunable external cavity quantum cascade laser for the simultaneous determination of glucose and lactate in aqueous phase. *Analyst* **2010**, 135 (12), 3260-3265.
9. Schwaighofer, A.; Brandstetter, M.; Lendl, B., Quantum cascade lasers (QCLs) in biomedical spectroscopy. *Chemical Society Reviews* **2017**, 46 (19), 5903-5924.
10. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US: 2007.
11. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Chapter 3 - Experimental Three-way/Second-order Data. In *Practical Three-Way Calibration*, Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Eds. Elsevier: Boston, 2014; pp 27-45.
12. Baeyens, W. R. G.; Ling, B. L., Analytical applications of enhanced drug luminescence. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1989**, 7 (12), 1385-1394.
13. Culzoni, M. J.; Aucelio, R. Q.; Escandar, G. M., Spectrofluorimetry in organized media coupled to second-order multivariate calibration for the determination of galantamine in the presence of uncalibrated interferences. *Talanta* **2010**, 82 (1), 325-332.
14. Díaz-García, M. E.; Badía-Laiño, R., Fluorescence | Fluorescence Derivatization☆. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier: 2018.
15. Jiménez Girón, A.; Durán-Merás, I.; Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A.; Cañada Cañada, F.; Olivieri, A. C., On line photochemically induced excitation–emission-kinetic four-way data: Analytical application for the determination of folic acid and its two main metabolites in serum by U-PLS and N-PLS/residual trilinearization (RTL) calibration. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 622 (1), 94-103.
16. Ménager, M.; Pan, X.; Wong-Wah-Chung, P.; Sarakha, M., Photochemistry of the pesticide azinphos methyl and its model molecule 1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one in aqueous

solutions: Kinetic and analytical studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, *192* (1), 41-48.

17. Zhu, S.-H.; Wu, H.-L.; Xia, A. L.; Nie, J.-F.; Bian, Y.-C.; Cai, C.-B.; Yu, R.-Q., Excitation-emission-kinetic fluorescence coupled with third-order calibration for quantifying carbaryl and investigating the hydrolysis in effluent water. *Talanta* **2009**, *77* (5), 1640-1646.

18. Wagner, B. D.; Sherren, A. C.; Rankin, M. A., Cyclodextrin-, UV-, and high pH-induced fluorescence enhancement of the pesticide azinphos-methyl: Applications to its trace analysis. *Canadian Journal of Chemistry* **2002**, *80* (9), 1210-1216.

19. Huertas-Pérez, J. F.; Arroyo-Manzanares, N.; Hitzler, D.; Castro-Guerrero, F. G.; Gámiz-Gracia, L.; García-Campaña, A. M., Simple determination of aflatoxins in rice by ultra-high performance liquid chromatography coupled to chemical post-column derivatization and fluorescence detection. *Food Chemistry* **2018**, *245*, 189-195.

20. Chen, L.; Fu, Y.-J.; Fang, W.-L.; Guo, X.-F.; Wang, H., Screening of a highly effective fluorescent derivatization reagent for carbonyl compounds and its application in HPLC with fluorescence detection. *Talanta* **2018**, *186*, 221-228.

21. Danzer, K.; Currie, L. A., Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). In *Pure and Applied Chemistry*, 1998; Vol. 70, p 993.

22. Booksh, K. S.; Kowalski, B. R., Theory of Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry* **1994**, *66* (15), 782A-791A.

23. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Chapter 1 - Calibration Scenarios. In *Practical Three-Way Calibration*, Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Eds. Elsevier: Boston, 2014; pp 1-9.

24. Wu, H.-L.; Li, Y.; Kang, C.; Yu, R.-Q., Chapter 3 - Multiway Calibration Based on Alternating Multilinear Decomposition. In *Data Handling in Science and Technology*, de la Peña, A. M.; Goicoechea, H. C.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C., Eds. Elsevier: 2015; Vol. 29, pp 83-165.

25. Olivieri, A. C., Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (10), 5358-5378.

26. Bro, R., PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1997**, *38* (2), 149-171.

27. Escandar, G. M.; Olivieri, A. C.; Faber, N. M.; Goicoechea, H. C.; Muñoz de la Peña, A.; Poppi, R. J., Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26* (7), 752-765.

28. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Chapter 4 - The MVC2 Software. In *Practical Three-Way Calibration*, Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Eds. Elsevier: Boston, 2014; pp 47-63.

29. Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2001**, *58* (2), 109-130.

30. Tauler, R., Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1995**, *30* (1), 133-146.

31. Wu, H.-L.; Shibukawa, M.; Oguma, K., An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC-DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemometrics* **1998**, *12* (1), 1-26.

32. Olivieri, A. C., Recent advances in analytical calibration with multi-way data. *Analytical Methods* **2012**, *4* (7), 1876-1886.

33. Jolliffe, I., Principal Component Analysis. In *International Encyclopedia of Statistical Science*, Lovric, M., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 1094-1096.
34. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Chapter 9 - Partial Least-Squares with Residual Bilinearization. In *Practical Three-Way Calibration*, Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Eds. Elsevier: Boston, 2014; pp 157-195.
35. Jaumot, J.; Gargallo, R.; de Juan, A.; Tauler, R., A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2005**, *76* (1), 101-110.
36. Ruckebusch, C.; Blanchet, L., Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *765*, 28-36.
37. Ruckebusch, C.; De Juan, A.; Duponchel, L.; Huvenne, J. P., Matrix augmentation for breaking rank-deficiency: A case study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2006**, *80* (2), 209-214.
38. de Juan, A.; Tauler, R., Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *500* (1), 195-210.
39. Windig, W.; Guilment, J., Interactive self-modeling mixture analysis. *Analytical Chemistry* **1991**, *63* (14), 1425-1432.
40. Sidiropoulos, N. D.; Bro, R., On the uniqueness of multilinear decomposition of N-way arrays. *Journal of Chemometrics* **2000**, *14* (3), 229-239.
41. Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Chapter 6 - Analytical Figures of Merit. In *Practical Three-Way Calibration*, Olivieri, A. C.; Escandar, G. M., Eds. Elsevier: Boston, 2014; pp 93-107.
42. Allegrini, F.; Olivieri, A. C., IUPAC-Consistent Approach to the Limit of Detection in Partial Least-Squares Calibration. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (15), 7858-7866.
43. O'Mahony, J. A.; Fox, P. F., *Milk: An Overview*. 2nd ed.; 2014.
44. Fox, P. F.; Uniacke-Lowe, T.; McSweeney, P. L. H.; O'Mahony, J. A., *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing: 2015; Vol. 145-239.
45. Boitz, L. I.; Mayer, H. K., Analytical assessment of the intense heat load of whipping cream, coffee cream, and condensed milk at retail in Austria and Germany. *Dairy Science & Technology* **2016**, *96* (5), 677-692.
46. Deeth, H., Optimum Thermal Processing for Extended Shelf-Life (ESL) Milk. *Foods* **2017**, *6* (11).
47. Schmidt, V. S. J.; Kaufmann, V.; Kulozik, U.; Scherer, S.; Wenning, M., Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* **2012**, *154* (1), 1-9.
48. Rysstad, G.; Kolstad, J., Extended shelf life milk—advances in technology. *International Journal of Dairy Technology* **2006**, *59* (2), 85-96.
49. Boitz, L. I.; Mayer, H. K., Extended shelf life milk – One concept, different qualities: A comprehensive study on the heat load of differently processed liquid milk retailed in Austria in 2012 and 2015. *LWT - Food Science and Technology* **2017**, *79*, 384-393.
50. Boitz, L. I.; Fiechter, G.; Seifried, R. K.; Mayer, H. K., A novel ultra-high performance liquid chromatography method for the rapid determination of β -lactoglobulin as heat load indicator in commercial milk samples. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1386*, 98-102.

51. Mayer, H. K.; Raba, B.; Meier, J.; Schmid, A., RP-HPLC analysis of furosine and acid-soluble β -lactoglobulin to assess the heat load of extended shelf life milk samples in Austria. *Dairy Science & Technology* **2010**, *90* (4), 413-428.
52. Ribadeau-Dumas, B.; Grappin, R., Milk protein analysis. *Lait* **1989**, *69* (5), 357-416.
53. Bobe, G.; Beitz, D. C.; Freeman, A. E.; Lindberg, G. L., Separation and Quantification of Bovine Milk Proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46* (2), 458-463.
54. Bordin, G.; Cordeiro Raposo, F.; de la Calle, B.; Rodriguez, A. R., Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2001**, *928* (1), 63-76.
55. Strange, E. D.; Malin, E. L.; Van Hekken, D. L.; Basch, J. J., Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. *Journal of Chromatography A* **1992**, *624* (1), 81-102.
56. Aernouts, B.; Polshin, E.; Saeys, W.; Lammertyn, J., Mid-infrared spectrometry of milk for dairy metabolomics: A comparison of two sampling techniques and effect of homogenization. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *705* (1), 88-97.
57. Mazurek, S.; Szostak, R.; Czaja, T.; Zachwieja, A., Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. *Talanta* **2015**, *138*, 285-289.
58. Kaylegian, K. E.; Lynch, J. M.; Houghton, G. E.; Fleming, J. R.; Barbano, D. M., Modified Versus Producer Milk Calibration: Mid-Infrared Analyzer Performance Validation1. *Journal of Dairy Science* **2006**, *89* (8), 2833-2845.
59. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2007**, *1767* (9), 1073-1101.
60. Bal Ram, S., *Infrared Analysis of Peptides and Proteins*. American Chemical Society: 1999.
61. van de Weert, M.; Haris, P. I.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A., Fourier Transform Infrared Spectrometric Analysis of Protein Conformation: Effect of Sampling Method and Stress Factors. *Analytical Biochemistry* **2001**, *297* (2), 160-169.
62. Fabian, H.; Mantele, W., *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken: 2006.
63. Brian, M. M.; Jennifer, D.; Antonio; Mark, C. M.; Wasfi, A.-A., Use of the Amide II Infrared Band of Proteins for Secondary Structure Determination and Comparability of Higher Order Structure. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2014**, *15* (9), 880-889.
64. Yang, H.; Yang, S.; Kong, J.; Dong, A.; Yu, S., Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nature Protocols* **2015**, *10*, 382.
65. Kuligowski, J.; Schwaighofer, A.; Alcaráz, M. R.; Quintás, G.; Mayer, H.; Vento, M.; Lendl, B., External cavity-quantum cascade laser (EC-QCL) spectroscopy for protein analysis in bovine milk. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *963*, 99-105.
66. Schwaighofer, A.; Kuligowski, J.; Quintás, G.; Mayer, H. K.; Lendl, B., Fast quantification of bovine milk proteins employing external cavity-quantum cascade laser spectroscopy. *Food Chemistry* **2018**, *252*, 22-27.
67. Savitzky, A.; Golay, M. J. E., Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* **1964**, *36* (8), 1627-1639.

68. Skov, T.; van den Berg, F.; Tomasi, G.; Bro, R., Automated alignment of chromatographic data. *Journal of Chemometrics* **2007**, *20* (11-12), 484-497.
69. Culzoni, M. J.; Goicoechea, H. C.; Ibañez, G. A.; Lozano, V. A.; Marsili, N. R.; Olivieri, A. C.; Pagani, A. P., Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral overlapping: A multivariate curve resolution—Alternating least-squares approach. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *614* (1), 46-57.
70. IDF/ISO, Milk and milk products - Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation. 2001.
71. IDF/ISO, Determination of casein-nitrogen content – Part 1: Indirect method (reference method). Brussels, 2004.
72. IDF/ISO, Determination of nitrogen content - Part 4: Determination of protein and non-protein nitrogen content and true protein content calculation (Reference method). Brussels, 2001.
73. IDF/ISO, Liquid milk — Determination of acid-soluble beta-lactoglobulin content — Reverse-phase HPLC method. Brussels, 2005.
74. Olivieri, A. C.; Goicoechea, H. C.; Iñón, F. A., MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2004**, *73* (2), 189-197.
75. Olivieri, A. C., Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *868*, 10-22.
76. González-Curbelo, M. Á.; Herrera-Herrera, A. V.; Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Borges, J., Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *38*, 32-51.
77. Food and agriculture organization of the United Nations – Global Information and Early Warning System on Food and Agriculture. Country brief, Argentina. <http://www.fao.org/giews/countrybrief/> (accessed 07/06/18).
78. European Commission Pesticide MRLs Regulation (EC) No. 396/2005 <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/> (accessed 07/06/18).
79. Rumbos, C. I.; Dutton, A. C.; Athanassiou, C. G., Comparison of two pirimiphos-methyl formulations against major stored-product insect species. *Journal of Stored Products Research* **2013**, *55*, 106-115.
80. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard. http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/ (accessed 07/06/18).
81. Roberts, J. R.; Reigart, J. R., *Recognition and Management of Pesticide Poisonings* 6th ed.; 2013.
82. Dirección Nacional de Agroquímicos, Productos Veterinarios y Alimentos del Senasa–Resolución-934-2010. <http://www.senasa.gov.ar/normativas/> (accessed 07/06/18).
83. Sharma, D.; Nagpal, A.; Pakade, Y. B.; Katnoria, J. K., Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta* **2010**, *82* (4), 1077-1089.
84. Liu, H.; Kong, W.; Qi, Y.; Gong, B.; Miao, Q.; Wei, J.; Yang, M., Streamlined pretreatment and GC–FPD analysis of multi-pesticide residues in perennial Morinda roots: A tropical or subtropical plant. *Chemosphere* **2014**, *95*, 33-40.

85. Wang, P.; Rashid, M.; Liu, J.; Hu, M.; Zhong, G., Identification of multi-insecticide residues using GC-NPD and the degradation kinetics of chlorpyrifos in sweet corn and soils. *Food Chemistry* **2016**, *212*, 420-426.
86. de Sousa, F. A.; Guido Costa, A. I.; de Queiroz, M. E. L. R.; Teófilo, R. F.; Neves, A. A.; de Pinho, G. P., Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. *Food Chemistry* **2012**, *135* (1), 179-185.
87. Marchis, D.; Ferro, G. L.; Brizio, P.; Squadrone, S.; Abete, M. C., Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. *Food Control* **2012**, *25* (1), 270-273.
88. Cazorla-Reyes, R.; Fernández-Moreno, J. L.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M., Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* **2011**, *85* (1), 183-196.
89. Padrón-Sanz, C.; Halko, R.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J. J., Combination of microwave assisted micellar extraction and liquid chromatography for the determination of organophosphorous pesticides in soil samples. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1078* (1), 13-21.
90. Catalá-Icardo, M.; Lahuerta-Zamora, L.; Torres-Cartas, S.; Meseguer-Lloret, S., Determination of organothiophosphorus pesticides in water by liquid chromatography and post-column chemiluminescence with cerium(IV). *Journal of Chromatography A* **2014**, *1341*, 31-40.
91. Woudneh, M. B.; Benskin, J. P.; Wang, G.; Grace, R.; Hamilton, M. C.; Cosgrove, J. R., Quantitative determination of 13 organophosphorous flame retardants and plasticizers in a wastewater treatment system by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1400*, 149-155.
92. Coly, A.; Aaron, J.-J., Cyclodextrin-enhanced fluorescence and photochemically-induced fluorescence determination of five aromatic pesticides in water. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *360* (1), 129-141.
93. Olivieri, A. C., On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties. *Journal of Chemometrics* **2005**, *19* (4), 253-265.
94. Rodríguez, N.; Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A., Fluorescence quantification of tetracycline in the presence of quenching matrix effect by means of a four-way model. *Talanta* **2009**, *77* (3), 1129-1136.
95. Rodríguez, N.; Real, B. D.; Cruz Ortiz, M.; Sarabia, L. A.; Herrero, A., Usefulness of parallel factor analysis to handle the matrix effect in the fluorescence determination of tetracycline in whey milk. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *632* (1), 42-51.
96. Wang, Y.; Veltkamp, D. J.; Kowalski, B. R., Multivariate instrument standardization. *Analytical Chemistry* **1991**, *63* (23), 2750-2756.
97. Garrido Frenich, A.; Picón Zamora, D.; Martínez Vidal, J. L.; Martínez Galera, M., Standardization of SPE signals in multicomponent analysis of three benzimidazolic pesticides by spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *477* (2), 211-222.
98. Weast, R. C., *CRC Handbook of Chemistry and Physics (Section E)*. 67th ed.; USA, 1986.
99. Olivieri, A. C.; Wu, H.-L.; Yu, R.-Q., MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2009**, *96* (2), 246-251.

100. González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. n. G., Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta* **1999**, *48* (3), 729-736.
101. Vessman, J.; Stefan Raluca, I.; van Staden Jacobus, F.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns Duncan, T.; Fajgelj, A.; Müller, H., Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). In *Pure and Applied Chemistry*, 2001; Vol. 73, p 1381.
102. Hornsby, A. G.; Wauchope, R. D.; Herner, A. E., *Pesticide Properties in the Environment*. Springer: New York, 1996.
103. Tanner, D. K.; Knuth, M. L., Effects of Azinphos-methyl on the Reproductive Success of the Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Littoral Enclosures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1995**, *32* (2), 184-193.
104. Schulz, R.; Hahn, C.; Bennett, E. R.; Dabrowski, J. M.; Thiere, G.; Peall, S. K. C., Fate and Effects of Azinphos-Methyl in a Flow-Through Wetland in South Africa. *Environmental Science & Technology* **2003**, *37* (10), 2139-2144.
105. Seebunrueng, K.; Santaladchaiyakit, Y.; Srijaranai, S., Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. *Chemosphere* **2014**, *103*, 51-58.
106. Masiá, A.; Ibáñez, M.; Blasco, C.; Sancho, J. V.; Picó, Y.; Hernández, F., Combined use of liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in systematic screening of pesticides and other contaminants in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *761*, 117-127.
107. Portolés, T.; Cherta, L.; Beltran, J.; Hernández, F., Improved gas chromatography-tandem mass spectrometry determination of pesticide residues making use of atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1260*, 183-192.
108. Walorczyk, S.; Drożdżyński, D., Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry revisited. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1251*, 219-231.
109. Mahpishanian, S.; Sereshti, H.; Baghdadi, M., Superparamagnetic core-shells anchored onto graphene oxide grafted with phenylethyl amine as a nano-adsorbent for extraction and enrichment of organophosphorus pesticides from fruit, vegetable and water samples. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1406*, 48-58.
110. Mahpishanian, S.; Sereshti, H., Three-dimensional graphene aerogel-supported iron oxide nanoparticles as an efficient adsorbent for magnetic solid phase extraction of organophosphorus pesticide residues in fruit juices followed by gas chromatographic determination. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1443*, 43-53.
111. Soisungnoen, P.; Burakham, R.; Srijaranai, S., Determination of organophosphorus pesticides using dispersive liquid-liquid microextraction combined with reversed electrode polarity stacking mode—micellar electrokinetic chromatography. *Talanta* **2012**, *98*, 62-68.
112. Bavcon Kralj, M.; Franko, M.; Trebše, P., Photodegradation of organophosphorus insecticides – Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. *Chemosphere* **2007**, *67* (1), 99-107.
113. Calza, P.; Massolino, C.; Pelizzetti, E., Light induced transformations of selected organophosphorus pesticides on titanium dioxide: Pathways and by-products evaluation using

LC–MS technique. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2008**, *199* (1), 42–49.

114. Yeasmin, L.; MacDougall, S. A.; Wagner, B. D., UV-A photochemistry of the pesticide azinphos-methyl: Generation of the highly fluorescent intermediate N-methylantranilic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, *204* (2), 217–223.

115. García Sánchez, F.; Gallardo, A. A., Spectrofluorimetric determination of the insecticide azinphos-methyl in cultivated soils following generation of a fluorophore by hydrolysis. *Analyst* **1992**, *117* (2), 195–198.

116. Zhang, Y.; Zhang, X.; Jiao, B., Determination of ten pyrethroids in various fruit juices: Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction sample preparation and QuEChERS method combined with dispersive liquid–liquid microextraction. *Food Chemistry* **2014**, *159*, 367–373.

117. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. J., Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International* **2003**, *86*, 412–431.

118. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M.-R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1116* (1), 1–9.

119. Olivieri, A. C.; Wu, H.-L.; Yu, R.-Q., MVC3: A MATLAB graphical interface toolbox for third-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2012**, *116*, 9–16.

120. Escandar, G. M.; Goicoechea, H. C.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A. C., Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *806*, 8–26.

121. Goicoechea, H. C.; Culzoni, M. J.; García, M. D. G.; Galera, M. M., Chemometric strategies for enhancing the chromatographic methodologies with second-order data analysis of compounds when peaks are overlapped. *Talanta* **2011**, *83* (4), 1098–1107.

122. Parastar, H.; Radović, J. R.; Jalali-Heravi, M.; Diez, S.; Bayona, J. M.; Tauler, R., Resolution and Quantification of Complex Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Heavy Fuel Oil Sample by Means of GC × GC-TOFMS Combined to Multivariate Curve Resolution. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (24), 9289–9297.

123. Lozano, V. A.; Muñoz de la Peña, A.; Durán-Merás, I.; Espinosa Mansilla, A.; Escandar, G. M., Four-way multivariate calibration using ultra-fast high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation–emission detection. Application to the direct analysis of chlorophylls a and b and pheophytins a and b in olive oils. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2013**, *125*, 121–131.

124. Alcaráz, M. R.; Siano, G. G.; Culzoni, M. J.; de la Peña, A. M.; Goicoechea, H. C., Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *809*, 37–46.

125. Siano, G. G.; Montemurro, M.; Alcaráz, M. R.; Goicoechea, H. C., Open-Source Assisted Laboratory Automation through Graphical User Interfaces and 3D Printers: Application to Equipment Hyphenation for Higher-Order Data Generation. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (20), 10667–10672.

126. Montemurro, M.; Siano, G. G.; Alcaráz, M. R.; Goicoechea, H. C., Third order chromatographic-excitation-emission fluorescence data: Advances, challenges and prospects in analytical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2017**, *93*, 119-133.
127. Carabajal, M. D.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M., On-line generation of third-order liquid chromatography-excitation-emission fluorescence matrix data. Quantitation of heavy-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1527*, 61-69.
128. Carabajal, M. D.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M., Multivariate curve resolution strategy for non-quadrilinear type 4 third-order/four way liquid chromatography-excitation-emission fluorescence matrix data. *Talanta* **2018**, *189*, 509-516.
129. Arancibia, J. A.; Olivieri, A. C.; Gil, D. B.; Mansilla, A. E.; Durán-Merás, I.; de la Peña, A. M., Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: New chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2006**, *80* (1), 77-86.
130. Damiani, P. C.; Durán-Merás, I.; García-Reiriz, A.; Jiménez-Girón, A.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A. C., Multiway Partial Least-Squares Coupled to Residual Trilinearization: A Genuine Multidimensional Tool for the Study of Third-Order Data. Simultaneous Analysis of Procaine and Its Metabolite p-Aminobenzoic Acid in Equine Serum. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (18), 6949-6958.
131. Bortolato, S. A.; Lozano, V. A.; de la Peña, A. M.; Olivieri, A. C., Novel augmented parallel factor model for four-way calibration of high-performance liquid chromatography-fluorescence excitation-emission data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2015**, *141*, 1-11.
132. Topuz, S.; Özhan, G.; Alpertunga, B., Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control* **2005**, *16* (1), 87-92.
133. Santa-Cruz, P.; García-Reiriz, A., Application of third-order multivariate calibration algorithms to the determination of carbaryl, naphthol and propoxur by kinetic spectroscopic measurements. *Talanta* **2014**, *128*, 450-459.
134. Rubio, L.; Sarabia, L. A.; Ortiz, M. C., Standard addition method based on four-way PARAFAC decomposition to solve the matrix interferences in the determination of carbamate pesticides in lettuce using excitation-emission fluorescence data. *Talanta* **2015**, *138*, 86-99.
135. Rodríguez-Cuesta, M. J.; Boqué, R.; Rius, F. X.; Picón Zamora, D.; Martínez Galera, M.; Garrido Frenich, A., Determination of carbendazim, fuberidazole and thiabendazole by three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *491* (1), 47-56.
136. Boeris, V.; Arancibia, J. A.; Olivieri, A. C., Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *814*, 23-30.
137. Asensio-Ramos, M.; Hernández-Borges, J.; Borges-Miquel, T. M.; Rodríguez-Delgado, M. Á., Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (30), 4808-4816.
138. Subhani, Q.; Huang, Z.; Zhu, Z.; Zhu, Y., Simultaneous determination of imidacloprid and carbendazim in water samples by ion chromatography with fluorescence detector and post-column photochemical reactor. *Talanta* **2013**, *116*, 127-132.

139. Wang, J.; Du, Z.; Yu, W.; Qu, S., Detection of seven pesticides in cucumbers using hollow fibre-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1247*, 10-17.
140. Raepfel, C.; Nief, M.; Fabritius, M.; Racault, L.; Appenzeller, B. M.; Millet, M., Simultaneous analysis of pesticides from different chemical classes by using a derivatisation step and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (44), 8123-8129.
141. Yang, E.-Y.; Shin, H.-S., Trace level determinations of carbamate pesticides in surface water by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with 9-xanthidol. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1305*, 328-332.
142. Moreno-González, D.; Huertas-Pérez, J. F.; García-Campaña, A. M.; Gámiz-Gracia, L., Vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification liquid–liquid microextraction for the determination of carbamates in juices by micellar electrokinetic chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* **2015**, *139*, 174-180.
143. Wang, M.; Huang, J.; Wang, M.; Zhang, D.; Chen, J., Electrochemical nonenzymatic sensor based on CoO decorated reduced graphene oxide for the simultaneous determination of carbofuran and carbaryl in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **2014**, *151*, 191-197.